



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PREDICCIÓN DEL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

ASAEL EDEM DE LA ROSA ZARIÑANA

Bajo la supervisión de: **Luis Alberto Miranda Romero, Dr.**



Chapingo, Estado de México, junio 2023



**PREDICCIÓN DEL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS**

Tesis realizada por **ASAEL EDEM DE LA ROSA ZARIÑANA**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Dr. Luís Alberto Miranda Romero

ASESOR:



Ph.D. Pedro Arturo Martínez Hernández

ASESOR:



Dr. Luis Manuel Vargas Villamil

LECTOR EXTERNO:



Dra. Deli Nazmín Tirado González

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
Literatura citada	5
CAPÍTULO 2. APPLICATION OF THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE FOR IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN RUMINANT NUTRITION: a review	7
ABSTRACT	7
KEYWORDS	7
INTRODUCTION.....	8
RISE AND PEAK OF THE GPT.....	9
FERMENTABLE FRACTIONS	10
ENVIRONMENTAL IMPACT INDICATORS	13
ANIMAL UTILIZATION OF THE FERMENTABLE FRACTION OF FEED in vitro AND in vivo.....	14
CONCLUSIONS	17
REFERENCES.....	18

CAPÍTULO 3. NIVEL DE PROTEÍNA Y ENERGÍA EN LA FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DIETAS PARA BORREGOS.....	26
RESUMEN	26
ABSTRACT	27
Key words.....	28
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Lugar y tratamientos	30
Cinética de la producción de gas de fermentación, degradación de la materia seca y fracciones fermentables <i>in vitro</i>	30
Indicadores de impacto ambiental	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	38
AGRADECIMIENTOS	38
LITERATURA CITADA.....	39
CONCLUSIONES GENERALES	47

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO 2. APPLICATION OF THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE FOR IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN RUMINANT NUTRITION: a review

Table 1. Effect of additives on the apparent digestibility and <i>in vitro</i> dry matter digestibility, and the fermentable fraction of the feed. Adapter from [60]	16
--	----

CAPÍTULO 3. NIVEL DE PROTEÍNA Y ENERGÍA EN LA FERMENTACIÓN IN VITRO DE DIETAS PARA BORREGOS

Tabla 1. Composición de dietas para la engorda intensiva de ovinos.....	44
Tabla 2. Parámetros de la cinética de producción de gas <i>in vitro</i> de las dietas para ovinos en engorda	45
Tabla 3. Fracciones fermentables y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS72h) de las dietas para ovinos de engorda a 72 h.....	46
Tabla 4. Indicadores de impacto ambiental y producción de gas <i>in vitro</i> a 24 h de incubación a 39 °C de dietas para ovinos de engorda	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. APPLICATION OF THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE FOR IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN RUMINANT NUTRITION: a review

Figure 1. Trend in the number of research articles published by decades from 1960 to 2020 in which the GPT was used, that of Tilley and Terry, 1963 (TT 1963), modified by Goering and Van Soest, 1970 (GVS1970). Academic Google, 03 April 2023	10
Figure 2. Gas production of glucose (GL), starch (ST) or cellulose (CE) fermented by rumen inoculum. Adapted from [78].	11
Figure 3. Lineal regression model to relationship IVDMD vs total fermentable fraction of feed (A), and maximum gas volume vs IVDMD (B) using the gas production technique. Adapted from [42, 43]	12
Figure 4. Fermentable fractions: fast (FFF), medium (MFF) and slow (SFF) of alfalfa harvested to 8:00 and 14:00 h. Adapted from [48]	13
Figure 5. Kinetics of gas production of feed offered (O), feed refusal (R), and feces from sheep-feed diets without silage (SE), with corn silage (CS), with prickly nopal pear cladode silage (EN), and with prickly nopal pear cladode silage + tuna (ENT). Adapted from [78].....	15

DEDICATORIAS

A ti Diosito por prestarme la vida y darme una familia que amar.

A mi amada Mónica, a ti mi amor por el apoyo, consejos, sacrificios y sobre todo por los momentos que has pasado a mi lado desde el día que nos conocimos y ese deseo de verte cada día, hoy se ha convertido en mi todo. Eres la luz de mi camino y la razón de mi existir.

A mis tres pequeñas hijas Atziri, Sofía y Mónica, ustedes son mi vida, desde el primer momento que supe que vendrían al mundo se convirtieron en mi más preciado tesoro, son mis ganas de vivir y mi más hermoso sueño. Ustedes nos han enseñado el significado de la vida, su ternura, sus abrazos, sus besos, su cariño me han mostrado qué tan valiosa es la vida. Nunca les fallaré, estaré siempre a su lado hermosas.

Con infinito amor y cariño a mis padres: Asael de la Rosa Galindo y Ma. Cecilia Zariñana Solórzano, por darme vida y una hermosa familia. Ustedes son mi inspiración, gracias por sus consejos, felicitaciones y correcciones, ya que sin ello no hubiera culminado esta parte importante de mi vida. Siempre han estado a mi lado en los malos y buenos momentos, y espero nunca fallarles. En verdad los amo papitos.

A mis hermanas Aurora, Alina, por su amor y compañía en toda mi vida, gracias por confiar ciegamente en mí. Sin ustedes no sería nada. Las amo.

A la familia Zaragoza Ortega por darme la oportunidad de ser parte de ustedes, les doy las gracias por todo el apoyo que me han brindado. Los quiero como a mis padres y mis hermanos.

A mi querido tío Dr. Gabriel de la Rosa Montes †, a pesar de su ausencia te llevamos en nuestros corazones. Mil gracias por sus consejos y atenciones incondicionales cuando más lo necesitamos.

A toda mi familia, por apoyarme en cualquier aspecto de mi vida, sé que sin su apoyo no hubiera culminado esta parte importante de mi vida.

A mis amigos y compañeros de vida, sé que donde quiera que estén siempre seguirán apoyándome.

Con todo mi amor y cariño:

Asael Edem

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante el proyecto de tesis doctoral 2019-2022.

A la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad una vez más de estar en sus brazos y poder realizar y culminar mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Producción Animal por darme la oportunidad de estudiar y culminar la formación académica que en sus gloriosas aulas me ofreció.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por haber dirigido este trabajo de investigación, agradezco de antemano y con todo el corazón su sinceridad y apoyo incondicional en toda mi estancia. Es usted, una persona maravillosa.

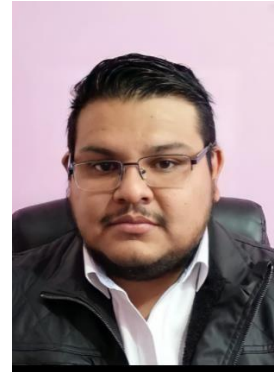
Al Dr. Pedro Arturo Hernández Martínez por su sincera amistad, apoyo absoluto y consejos oportunos en todo el periodo doctoral.

Al Dr. Luis Manuel Vargas Villamil por su apoyo en mi formación académica, aportaciones, opiniones y revisiones del trabajo.

Al Dr. Rafael Núñez Domínguez por el apoyo incondicional, orientación y tiempo necesario para la revisión de este documento. Así como también agradezco todos los profesores del Posgrado en Producción Animal por ser guías en mi formación académica y social.

Al personal del Laboratorio de Microbiología Pecuaria, Laura y Carmen por el tiempo dedicado a este trabajo de investigación, sus aportaciones y opiniones fueron muy importantes para el desarrollo y término.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Asael Edem de la Rosa Zariñana
Fecha de nacimiento	24 de diciembre de 1988
Lugar de nacimiento	Camotinchán, Ixcapa, Jamiltepec, Oaxaca.
CURP	ROZA881224HOSCRS02
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula Profesional	11510181

Desarrollo académico

Doctorado en Ciencias (2019-2022)	DEIS en Zootecnia Posgrado en Producción Animal Universidad Autónoma Chapingo
Maestría en Ciencias (2014-2016)	Colegio de Posgraduados Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería
Licenciatura (2008-2012)	DEIS en Zootecnia Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

PREDICCIÓN DEL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS¹

En los sistemas de producción de rumiantes es fundamental conocer el valor nutritivo del alimento utilizado, compuesto por la palatabilidad, contenido y disponibilidad de los nutrientes. En el primer trabajo se analiza la técnica de producción de gas (TPG) para la generación de variables útiles en las unidades de producción ovinas. La TPG se ha usado para calcular la fracción fermentable rápida (FFR), media (FFM), lenta (FFL) y total (FFT) del alimento, la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), indicadores de impacto ambiental relacionados con la producción de metano (índice potencial de calentamiento global, IPCG; índice de impacto ambiental, IIA) y la fracción fermentable total del alimento (FPFA), cuyos resultados mostraron la factibilidad y utilidad práctica de estas variables. En la segunda investigación se determinó el efecto del nivel de energía (EM) y proteína (PC) de tres dietas balanceadas a nivel bajo (BB), medio (MM) y alto (AA), y dos desbalanceadas (AB y BA) en la DIVMS, el volumen (V_m), tasa (S) y fase Lag (L) de la producción de gas, la FFR, FFM, FFL, la producción de metano, el IPCG e IIA. La S fue superior ($p<0.05$) en las dietas AA y AB, y el V_m fue menor ($p<0.05$) para la dieta BA. La dieta AA tuvo las mayores ($p<0.05$) FFR y FFM. Las dietas BA y BB tuvieron la mayor ($p<0.05$) FFL, pero menor DIVMS72h ($p<0.05$). Respecto al impacto ambiental, la dieta BB produjo la mayor cantidad ($p<0.05$) de CH_4 , IPCG e IIA. Se concluyó que las dietas con contenido mayor de carbohidratos no estructurales tienen mejor cinética fermentativa y digestibilidades, también generan menores proporciones de CH_4 , IPCG y IIA, estos últimos pueden usarse como indicadores del impacto ambiental por considerar al CO_2 y CH_4 producidos por los consorcios microbianos del rumen.

Palabras clave: fermentación, cinética, selectividad, impacto ambiental

¹ Tesis de Doctorado en Ciencias en Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Asael Edem de la Rosa Zariñana
Director: Luis Alberto Miranda Romero

GENERAL ABSTRACT

PREDICTION OF THE PRODUCTIVE BEHAVIOR OF SHEEP THROUGH THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE¹

In ruminant production systems is essential to know the nutritional value of the feed used, made up of palatability, content, and availability of nutrients. The first paper analyzes the gas production technique (TPG) for generating useful variables in sheep production units. The TPG has been used to calculate the fast (FFR), medium (FFM), slow (FFL), and total (FFT) fermentable fraction of feed, *in vitro* digestibility of dry matter (DIVMS), environmental impact indicators related to methane production (global warming potential index, IPCG; environmental impact index, IIA) and the total fermentable fraction of the feed (FPFA), whose results showed the feasibility and practical utility of these variables. In the second investigation, it was determined the effect of the energy (EM) and protein (PC) levels of three balanced diets at low (BB), medium (MM) and high (AA), and two unbalanced (AB and BA) on EM and PC, IVDMS, volume (Vm), rate (S) and Lag (L) phase of gas production, FFR, FFM, FFL, methane production, IPCG, and IIA. The S was higher ($p<0.05$) in the AA and AB diets, and the Vm was lower ($p<0.05$) for the BA diet. The AA diet had the highest ($p<0.05$) FFR and FFM. The BA and BB diets had the highest ($p<0.05$) FFL but the lowest IVMD72h ($p<0.05$). Regarding the environmental impact, the BB diet produced the highest amount ($p<0.05$) of CH₄, IPCG and IIA. It was concluded that diets with a higher content of non-structural carbohydrates have better fermentative kinetics and digestibilities; they also generate lowest proportions of CH₄, IPCG, and IIA, the latter can be used as indicators of an environmental impact considering the CO₂ and CH₄ produced by microbial consortia from the rumen.

Keywords: Fermentation, kinetics, selectivity, environmental impact

¹Doctoral Thesis in Livestock Innovation, Graduate Program in Animal Production, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Asael Edem de la Rosa Zariñana

Advisor: Luis Alberto Miranda Romero

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los estudios de digestibilidad y cinética de la fermentación de alimentos utilizando la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG) (Menke & Steingass, 1988; Theodorou, Williams, Dhanoa, McAllan, & France, 1994) han ido en aumento, desplazando a otras técnicas importantes como las planteadas por Tilley y Terry (1963), o su modificación por Goering y Van Soest (1970). A pesar de que estas últimas han sido validadas con la digestibilidad *in vivo*, no determinan la dinámica de la fermentación (Getachew, Blümmel, Makkar, & Becker, 1998; Khan Mahr-Un-Nisa, & Sarwar, 2003).

La TPG es una herramienta de laboratorio útil, económica y requiere poco tiempo para su determinación, con la cual se puede estimar el valor nutricional de las dietas para rumiantes, del mismo modo que otros métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. La TPG no sólo determina la extensión de la fermentación, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado directamente como un producto de la fermentación y producción de ácidos grasos volátiles como propionato, acetato y butirato (Posada & Noguera, 2005). La técnica se basa en el supuesto de que el gas producido proveniente de sustratos es directa o indirectamente resultado de la fermentación de una cantidad dada de éste (López et al., 2007; Rymera, Huntington, Williams, & Givens, 2005).

Las curvas de producción de gases generados pueden describirse mediante modelos matemáticos tales como exponenciales, logísticos o empíricos, entre otros (Posada & Noguera, 2005). Su uso dependerá del objetivo para el cual se obtienen los datos, por ejemplo: valor nutritivo de los forrajes, investigación básica sobre ecología microbiana ruminal o efecto de aditivos (Bruni & Chilibraste, 2001).

La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de sustratos y la evaluación de diferentes ambientes de fermentación, y proporciona información sobre las tasas de

fermentación de los constituyentes solubles y estructurales (Groot, Cone, Williams, Debersaques, & Lantinga, 1998; Noguera et al., 2004).

La degradación y proporción de los carbohidratos estructurales y no estructurales afectan la microbiota ruminal y las enzimas endógenas, así como la producción y cinética de gas durante la fermentación (Murillo, Herrera, Carrete, Ruiz, & Serrato, 2012). En este sentido, se ha estudiado la extensión de la fermentación con base en el tiempo de degradación y producción de gas de los carbohidratos contenidos en el alimento, de tal manera que se han clasificado en fracciones de rápida, media y lenta fermentación (Miranda-Romero et al., 2020).

Como se mencionó, la producción de gas derivada de la fermentación del alimento se ha relacionado con el nivel de energía y proteína que contiene, ya que la biomasa microbiana y los ácidos grasos volátiles resultantes de dicha fermentación pueden aportar del 70-100 % de las necesidades de aminoácidos en forma de proteína microbiana y del 70-85 % de la energía al rumiante (Castillo-López & Domínguez-Ordóñez, 2019; Ørskov, 1992).

En este sentido, es factible detectar diferencias en las variables fermentativas, particularmente en el volumen máximo de gas (V_m), y entre fuentes (alimento vs heces), lo cual está relacionado con la cantidad de energía y proteína del alimento. Por lo anterior, la TPG se considera un método factible de aplicarse en pruebas *in vivo* para determinar la asimilación del alimento por corderos, en función de su contenido de energía y proteína (Chávez & Martínez, 2014).

Si bien, una aplicación de la TPG *in vitro* es estimar la digestibilidad del alimento que se le ofrece a ovinos, también se ha utilizado para determinar la cantidad de biomasa microbiana (Rodríguez, Sosa, & Rodríguez 2008), AGV's (Huertas-Molina et al., 2020) y el CH_4 producido en el rumen (Elghandour et al., 2017; Méndez et al., 2018; Vargas, Pabón, & Carulla, 2014). Sin embargo, de la abundancia de estudios relacionados con la degradación del alimento, existen

pocas investigaciones en donde se realiza la modelación matemática de la TPG para desarrollar variables útiles y prácticas en las unidades de producción ovinas.

El Capítulo 2 de este documento hace referencia a la revisión de literatura, del cual se generó un artículo titulado “Application of the gas production technique for *in vitro* and *in vivo* studies in ruminant nutrition: a review”, cuyo objetivo fue exponer algunos resultados que sustentan la factibilidad y utilidad de aplicar la TPG en estudios *in vitro*, para determinar las fracciones fermentables del alimento e indicadores de impacto atmosférico; así como variables indicadoras de la utilización de la fracción fermentable del alimento en el tracto gastrointestinal del rumiante y, de la emisión de gases efecto invernadero (GEI) considerando su comportamiento alimenticio.

El Capítulo 3 considera un artículo producto del trabajo de tesis, titulado “Nivel de proteína y energía en la fermentación *in vitro* de dietas para borregos”, el cual resume el efecto de dietas balanceadas y desbalanceadas sobre la cinética de fermentación y las fracciones fermentables.

Literatura citada

- Bruni, M. A., & Chilbroste, P. (2001). Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivo Latinoamérica Producción Animal*, 9(1), 43-51.
- Castillo-López, E., & Domínguez-Ordóñez, M. G. (2019). Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(1), 120-148.
- Chávez, H. G., & Martínez, L. (2014). *Producción de gas in vitro como método para determinar la asimilación de dietas por corderos*. (Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. México), 55 p.
- Elghandour, M. M. Y., Vázquez, J. C., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E., Cipriano, M. M., Camacho, L. M., & Márquez, O. (2017). In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 389-395, DOI: 10.1080/09712119.2016.1204304.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), 261-281.
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C. Disponible en <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF>, consultado el 26 de febrero de 2019.
- Groot, J. C. J., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. A., & Lantinga, E.A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64,77-89.
- Khan, M. A., Mahr-Un-Nisa, & Sarwar, M. (2003). Techniques Measuring Evaluation of Feeds Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5(1), 91–94.
- López, S., Dhanoa, M. S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., & France, J. (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 135(1–2), 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.005>
- Méndez, M. E., Cisneros, G., Cruz, M. R. G., Miranda, L. G. C., Díaz, R. M., Ramírez, L. C., ..., & Rayas, A. A. A. (2018). Effect of feeding level on *in vitro* methane gas production. *Agroproductividad*, 11(11),77-81.

- Menke, K. E., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal research and development*. 27, 7-55.
- Miranda-Romero, L. A., Tirado-González, D. N., Tirado-Estrada, G., Améndola-Massiotti, R., Sandoval-González, L., Ramírez-Valverde, R., & Salem, A. Z. (2020). Quantifying non-fibrous carbohydrates, acid detergent fiber and cellulose of forage through an *in vitro* gas production technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 3099-3110.
- Murillo, M., Herrera, E., Carrete, F. O., Ruiz, O., & Serrato, J. S. (2012). Chemical Composition, *in vitro* Gas Production, Ruminal Fermentation and Degradation Patterns of Diets by Grazing Steers in Native Range of North Mexico. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(10), 1395-403.
- Noguera, R. R., Saliba, E.O., & Mauricio, R. M. (2004). Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*, 16 (11).URL: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/noqu16086.htm>
- Ørskov, E. R. 1992. Protein Nutrition in Ruminants (2nd Ed). New York, EUA: Academic Press.
- Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(36) Revisado el 5 de octubre de 2021, de <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>
- Rodríguez, R., Sosa, A., & Rodríguez, Y. (2008). Modelos de predicción y métodos de estimación de la producción de proteína microbiana en el rumen. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2), 123-131.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 9-30.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48 (3-4), 185-197.
- Tilley, J. M., & Terry, R. A. (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18, 104-111.
- Vargas, J., Pabón, M., & Carulla, J. (2014). *In vitro* methane production in the incubation of mixtures of grasses and legumes from colombian high-altitude areas. *Archivos de Zootecnia*, 63 (243), 397-407.

CAPÍTULO 2. APPLICATION OF THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE FOR IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN RUMINANT NUTRITION: a review

Asael Edem De la Rosa-Zariñana¹, Luis Alberto Miranda-Romero^{1}, Germán David Mendoza-Martínez², Pedro Arturo Martínez-Hernández¹, Luis Manuel Vargas-Villamil³, Amaury Ábrego-García¹*

¹Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

³Colegio de Postgraduados, campus Tabasco.

*Author for correspondence: microbiologia.pecuaria08@gmail.com.mx

ABSTRACT

Different in vivo, in situ, and in vitro assays have been developed to determine the nutritional value of the feeds. The in vitro gas production technique (GPT) has become relevant due to the practicality of the method; however, the application of this technique is limited to determining the kinetics of gas production, whose unit ($\text{mL g}^{-1} \text{DM}$) has no practical utility for livestock producers. This systematic review aims to analyze the feasibility of applying the GPT to obtain other practical variables of rumen fermentation. It was found that the GPT has been used to obtain indicators of the fast (FFF), medium (MFF), slow (SFF), total (TFF) fermentable fractions, and the in vitro dry matter digestibility (IVDMD) of the feed. Linear regression equations were used to analyze the relationship between these last variables and the maximum volume of gas produced. The GPT was also used to estimate environmental impact variables such as the global warming potential index (GWPI) and the environmental impact index (EII); as well as the total fermentable fraction of the feed (TFFF) in the rumen expressed, whose results showed the practical utility of these variables for a better understanding of feed quality and rumen microbial activity.

KEYWORDS

Fermentation, Kinetics, Methane, Rumen, Selectivity

INTRODUCTION

The nutritional value of feed for animal production is defined by its palatability, nutritional composition, and digestibility [1]. The chemical analysis reveals the nutrient content of the feeds; however, it does not indicate their availability for the animal, making it necessary to evaluate their digestibility with *in vivo*, *in situ*, and *in vitro* techniques. *In vivo* techniques determine the proportion of feed that disappears in the gastrointestinal tract or the rumen under natural conditions of feed intake, digestive physiology, and animal behavior; however, they are exhaustive and expensive due to the amount of feed, highly qualified labor, and infrastructure required, which limits the number of animals and feeds that can be analyzed. Still, *in situ* techniques estimate the disappearance of feed, require cannulated animals and are also expensive [2,3].

On the other hand, *in vitro* digestibility techniques (IVDMD) estimate the disappearance of feed with greater precision, with the drawback that the digestive physiology and feeding behavior of the animal are not considered, nor are the handling conditions of the ruminant [4-6]. IVDMD has a high relationship with *in vivo* digestibility ($\text{Dig}_{\text{in vivo}}$), mainly with forages ($\text{Dig}_{\text{in vivo}} = 4.81 + 0.842 \cdot \text{IVDMD}$ $R^2=77.5$) [7,8]. GPT is increasingly used in ruminant nutrition studies to determine feed digestibility and fermentation [9,10] instead of *in vitro* digestibility (IVDMD) [11,12]. Both techniques (GPT and IVDMD) are practical, inexpensive, and fast compared to *in vivo* and *in situ* assays [13,14].

The GPT has become relevant because, among other reasons, it estimates both the extent of dry matter (DM) degradation and the fermentation kinetics of the feed with a high degree of sensitivity and reproducibility [3,15,16]. The kinetics of gas production describes a sigmoid curve adjusted to exponential, logistic, and empirical mathematical models, whose parameters (V_m , maximum volume; S , rate; L , Lag phase) refer to growth kinetics of rumen microbial consortia as a whole and to the fermentative and digestive quality of the feed [17,18]. These parameters are modified by the composition of the diet, the pretreatment of the feed and the inclusion of additives and secondary compounds. GPT is also used to quantify methane production [19-23], although it is questioned due to the poor or null viability and survival of rumen protozoa *in vitro* [24-26], which are important suppliers of H_2 as methane precursor.

Despite the technical, economic, and practical advantages, as well as the abundant information regarding the GPT, two questions arise: What other applications and other variables of practical utility can be obtained with the GPT which consider the management conditions and feeding behavior of the ruminant? Thus, this systematic review exposes: (i) some results that support the feasibility and usefulness of applying the GPT to determine the fermentable fractions of feed and indicators of atmospheric impact *in vitro*, (ii) the GPT approach to obtain

indicator variables of the use of the fermentable fractions of the feed in the ruminant's gastrointestinal tract considering the greenhouse gas (GHG) emissions.

RISE AND PEAK OF THE GPT

The first studies to estimate the microbial fermentation rate of carbohydrates by gas volume were done with the water displacement method [27]. Subsequently, El-Shazly et al. [28] measured the volume of trapped gas in glass syringes, and in 1974 a pressure transducer was used to measure accumulated gas in vials [29]. Czerkawski and Breckenridge [30] conducted a series of trials to quantify gas production using glass syringes and methanogenesis. This study served as the basis for mechanizing the measurement of accumulated gas in glass syringes in a rotor [31].

The procedures currently used to measure gas production are based on the studies by [9, 10, 32, 33], who used glass syringes, a water displacement manometer, and gas pressure transducers coupled to computerized electronic sensors. This last methodology was modified to facilitate the study of feed fermentation and gas production kinetics, such as the *in vitro* fermentation model [34-36].

A simple Google Scholar search (April 15, 2023) with the keywords "in vitro, digestibility, and rumen" returned 97,100 documents, while "in vitro gas production rumen" resulted around 101,000 documents. In a more specific search for decades from 1961 to 2020 and adding to the previous keywords, the authors Tilley and Terry (TT) [11]; and Goering and Van Soest (GVS) [12] for the IVDMD technique showed an accelerated growth in the use of GPT, particularly in the last two decades. However, the total sum of articles for the GPT from 1961 to 2020 was lower (18,775) than the sum of TT 1,963 and GVS 1,970 (21,931; Figure 1).

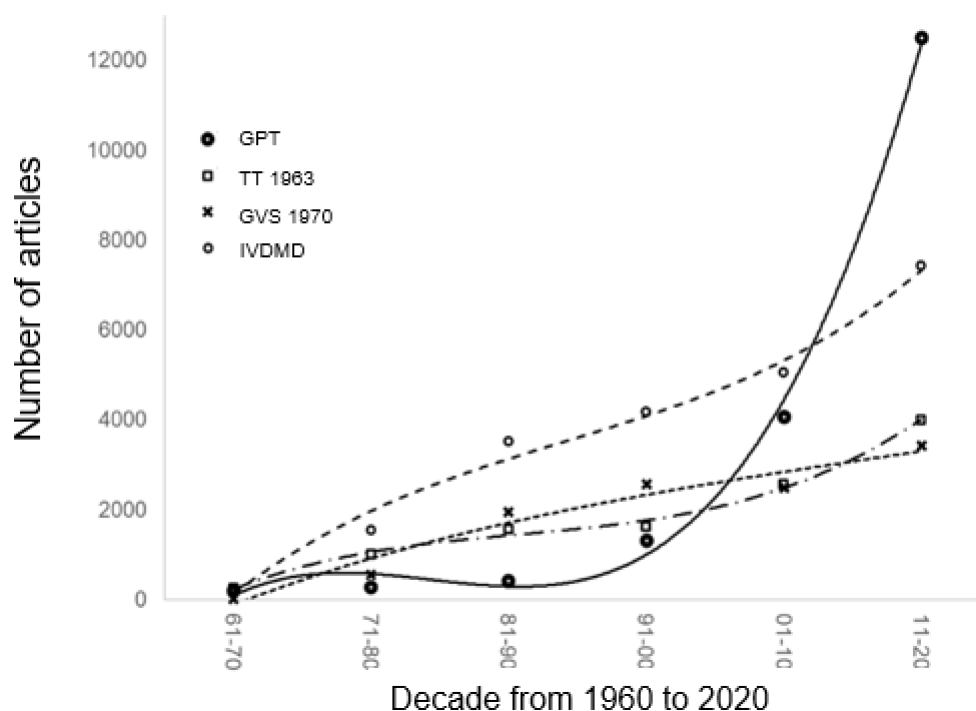


Figure 1. Trend in the number of research articles published by decades from 1960 to 2020 in which the GPT was used, that of Tilley and Terry, 1963 (TT 1963), modified by Goering and Van Soest, 1970 (GVS1970). Academic Google, 03 April 2023.

The GPT is used to evaluate the feed quality, fermentative modulation of the rumen, and potential methane emission. In the Animal Microbiology Laboratory of the UACH, the application of the GPT is investigated to obtain other practical variables in vitro and in vivo. These proposals are presented in this review.

FERMENTABLE FRACTIONS

The determination of fermentable fractions by GPT is justified because carbohydrates constitute ruminant feeds as an energy source (soluble sugars, storage polysaccharides, structural polysaccharides) and very diverse nitrogenous compounds, a degradable and non-degradable protein with variable ruminal digestion rates [37-39], which could help to synchronize the availability of these nutrients to optimize the production of volatile fatty acids (VFA) and synthesis of microbial protein [40-41]. In addition, the gas production expressed in mL g⁻¹ DM or organic matter (OM) is not a practical utility for livestock producers; it is better to express it as a percentage, mg g⁻¹ or g kg⁻¹ of feed, as it is with the fermentable fractions [42-46]. [47, 48] proposed a simple procedure with the GPT

to transform the volume of gas ($\text{mL g}^{-1} \text{ DM}$) accumulated in three incubation intervals (0 to 8, 8 to 24, and 24 to 72 h) to fermentation fractions fast, medium, and slow (FFF, MFF, and SFF) using simple regression equations: $\text{FFF (mg g}^{-1}) = V_{0-8}/0.427$; $\text{MFF (mg g}^{-1}) = V_{8-24}/0.615$; and $\text{SFF (mg g}^{-1}) = V_{24-72}/0.345$. Currently, the SFF is calculated with the gas accumulated between 24 and 48 h (V_{24-48}) of incubation to reduce the error of overestimation of the SFF associated with the production of gas caused by the fermentation of dead microbial biomass [48] (Figure 2).

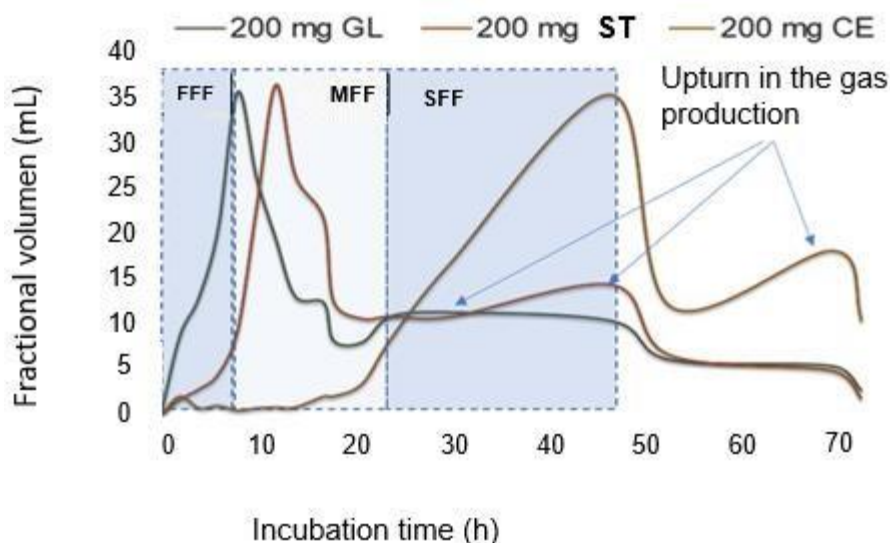


Figure 2. Gas production of glucose (GL), starch (ST) or cellulose (CE) fermented by rumen inoculum. Adapted from [78].

The sum of the three fractions corresponds to the TFF, and this, as well as the V_m shows a high relationship ($R^2=0.622$ and 0.7388) with the IVDMD ($V_m = -14.13 + 3.99 \cdot \text{IVDMD}$ and $\text{IVDMD} = 15.73 + 0.0527 \cdot \text{TFF}$), which gives the possibility of estimating IVDMD in a more practical way through TFF (Figure 3) [42,49]. The estimation of the IVDMD through the V_m has practical implications since it eliminates using a drying oven, filter paper, vacuum pump, balance, desiccator, and reduces the determination time. In addition, IVDMD is an apparent digestibility, not a true one, since it includes the microbial biomass attached to the undigested feed particles [50].

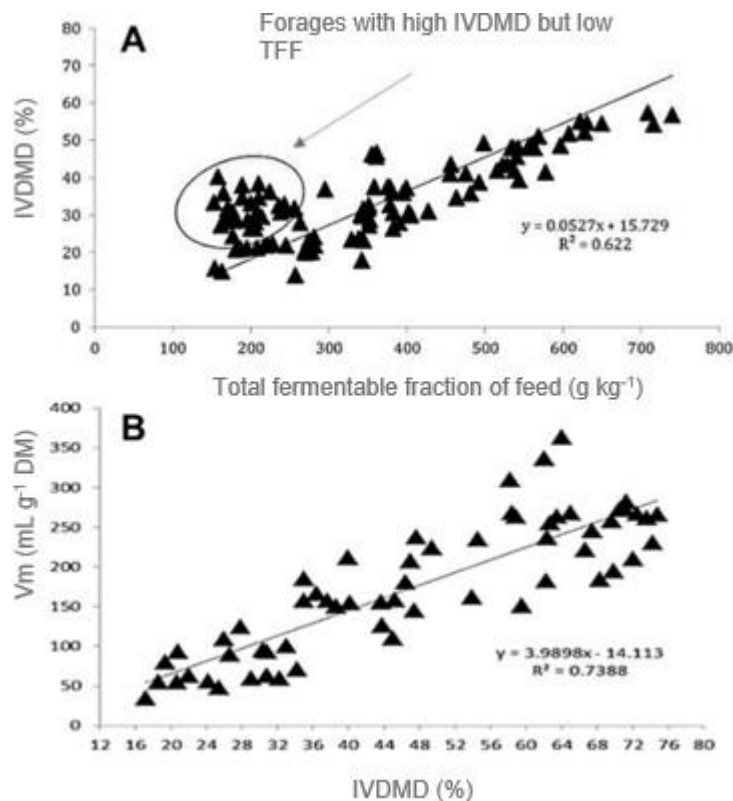


Figure 3. Lineal regression model to relationship IVDMD vs total fermentable fraction of feed (A), and maximum gas volume vs IVDMD (B) using the gas production technique. Adapted from [42, 43]

The TFF or the V_m do not always correlate directly and positively with the IVDMD. In this context, [42, 51] observed that the IVDMD was high for the cladodes of specific nopal cultivars and the foliage of some shrub species, but its TFF was low, showing a negative correlation ($R = -0.4856$, $P = 0.0410$). According to [42], the forage species that showed had a higher concentration of secondary compounds, which could feasibly inhibit the fermentative metabolism but not the digestive one since, as is generally known, they are very different metabolic pathways that were carried out in different sites (extracellular vs. intracellular) in bacteria and involve diverse enzymes and are therefore affected differently by chemical, biochemical, and physical factors. These results motivated the research area for linear models to estimate the content of neutral detergent fiber, starch, hemicellulose, and cellulose through GPT [44].

The GPT is a sensitive and reliable method to detect changes in the fermentable fractions [48,52]; this was demonstrated by measuring the fermentable fractions in alfalfa harvested at 8 vs 14 h of the day. The investigation mentioned above

showed that the FFF and MFF increased ($P<0.05$) 7.6 and 27.1 g kg⁻¹ of forage DM in alfalfa harvested at 14 h compared to that harvested at 0-8 h of the day (Figure 4), it was attributed to the greater exposure to sunlight and, consequently, greater photosynthetic activity, manifesting itself in an increase of soluble sugars and starch. The fermentable fractions can be modified by the variety of forage, changes in the composition of the diet, the pretreatment of the feed, the inclusion of additives, and secondary compounds [42,51, 53-60].

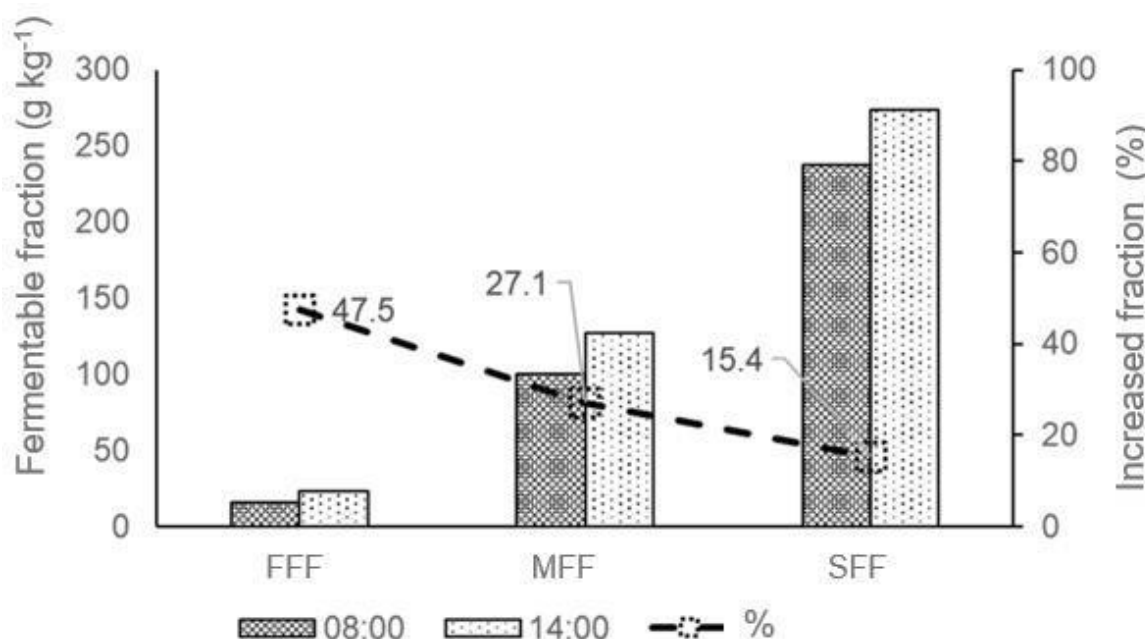


Figure 4. Fermentable fractions: fast (FFF), medium (MFF) and slow (SFF) of alfalfa harvested to 8:00 and 14:00 h. Adapted from [48]

ENVIRONMENTAL IMPACT INDICATORS

The emissions of methane and carbon dioxide from ruminants contribute to the atmospheric accumulation of GHG. The methane production by ruminant livestock constitutes 17% of the total global CH₄ budget and 3.3% of GHG emissions [61,62]; therefore, it is essential to measure CH₄ production as part of ruminant nutrition studies where the effect of diet and feed additives on the reduction of methane production and others GHG emissions by livestock can be assessed [14,62].

As mentioned above, the GPT estimates the potential methane production by rumen microorganisms during the fermentation of feed substrates [54,63]. The proportion of methane in the total gas production is commonly measured by gas chromatography and is the most accepted and precise method for its

determination; however, this technique is expensive and not very accessible for most laboratories and for determinations under field conditions because it requires a gas chromatograph, carrier gas, specific facilities, and qualified labor. Another procedure, less exact but more practical, consists of capturing the volume of CO₂ from the fermentation gas mixture in a potassium hydroxide (KOH) solution (1 N); the remaining gas volume corresponds to CH₄ and minor gases [13,14, 64, 65]. In order to adjust these last values to methane, they can be multiplied by the factor 0.77 according to the composition of the ruminal gas (67% CO₂, 26% CH₄, 7% N₂ and <1% O₂, H₂, and H₂S) [66]. The determination of methane by GPT has a high relationship with the methane production determined in vivo by open circuit respirometry with a difference of 6.8% and between the methane measurements by chromatography and KOH trap (1 M) ($CH_4CHR=1.25+0.9*CH_4GPT$; $R^2=0.99$) [67,68].

Regardless of the technique used to determine methane in vitro, it is expressed as %CH₄ or mL of CH₄ g⁻¹ DM [54,59,63], whose practical utility is merely comparative between experiment treatments. The GWPI and EII obtained with the GPT consider the contribution of CH₄ and rumen CO₂ to global warming. The GWPI is expressed in mL CO₂ eq g⁻¹ DM and assumes that one milliliter of CH₄ produced is equivalent to 23 times the calorific effect (global warming) of one milliliter of CO₂ produced [59,69,70]. The EII relates the GWPI to the maximum volume of gas ($EII=GWPI/V_m$) and considers that the V_m is constituted exclusively of CO₂; hence, the EII refers to how many units of CO₂ eq of feed impact global warming.

ANIMAL UTILIZATION OF THE FERMENTABLE FRACTION OF FEED in vitro AND in vivo

The most considerable criticism that GPT receives is for being in vitro, far from natural conditions, because it does not consider animal behavior and management. The V_m is associated with the amount of fermented DM [10,16], mainly carbohydrates, which represent 70 to 85% of the organic matter (OM) of the forages [71,72] and are the main source of fermentable energy for ruminant hosts and their associated rumen microbial communities.

Based on this, gas production was used in regression models to determine the metabolizable energy (ME) and digestibility of OM [73-75]. In this context, the V_m and TFF can be used as indicators or direct markers of the proportion of potentially fermentable fraction of the feed (TFFF) for in vivo studies, where the rumen inoculum is used only to determine the V_m or TFFF. These variables (V_m, TFFF) are estimated for the feed offered (Fo), feed refusal (Fr), and feces (Fe). The gas produced by Fe represents the unused TFFF in the animal's

gastrointestinal tract (GIT) [58,60,76,77]. These authors verified that the Vm (TFFF) is lower in the Fa, as expected, compared to that of the offered feed and the feed refusal (Figure 5). It was found that the TFFF (Vm) in the Fr was lower than that of the Fo in sheep-fed diets without silage, with corn silage, and with prickly nopal pear cladode silage, but in sheep fed with nopal cladode silage, it was the same [58]. In agreement with this, [59,77] proposed to evaluate a selectivity index ($SI = VmFo - VmFr$) which can be classified as low, medium, or high selectivity if it takes values from 0 to 75, 75 to 150 and higher than 150 mL g⁻¹ DM.

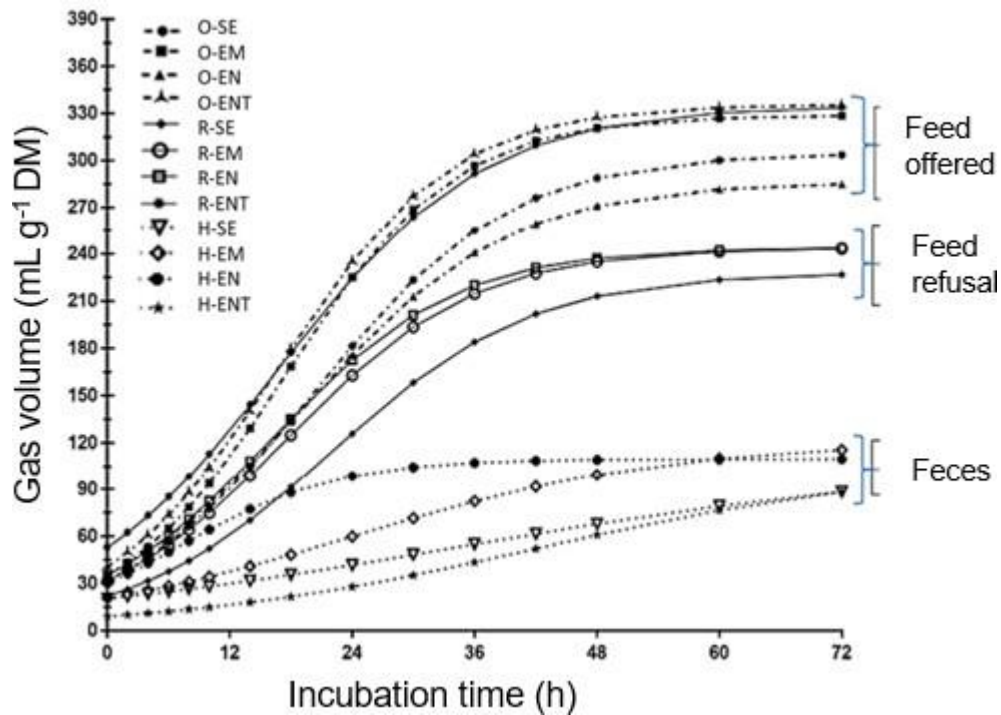


Figure 5. Kinetics of gas production of feed offered (O), feed refusal (R), and feces from sheep-fed diets without silage (SE), with corn silage (CS), with prickly nopal pear cladode silage (EN), and with prickly nopal pear cladode silage + tuna (ENT). Adapted from [78].

In this sense, also the difference in the TFFF (Vm) of the offered feed and Fe can be used as an indicator of the assimilation or digestion of the TFFF in the GIT of the animal (assimilation index; AI, or in vitro digestibility by TPG; ID_{GPT}) in the GIT, comparable to the apparent digestibility in sheep (Table 1) [60]. The SI and AI of the potentially fermentable fraction of the feed (TFFF) can be obtained considering the amount (g animal⁻¹ d⁻¹) of Fo, Fr, or Fe per animal. These values would be more attached to the natural conditions of animal management and the production system. Since the values of Vm (TFFF) when multiplied by the amount

of F_o , F_r , or F_e , are very large, so they must be expressed in decalitres (daL) or hectoliters (hL) for sheep and goats, and for cattle [78].

$$SI \text{ (daL animal}^{-1}\text{d}^{-1}) = [(Vm * F_o) - (Vm * F_r)]/10,000 \quad \text{Ec (1)}$$

$$AI \text{ (hL animal}^{-1}\text{d}^{-1}) = [(Vm * F_o) - (Vm * F_r) - (Vm * F_e)]/100,000 \quad \text{Ec (2)}$$

Where: SI, selectivity index; AI, assimilation index; Vm, maximum volume; F_o , feed offered; F_r , feed refused; F_e , feces.

Table 1. Effect of additives on the apparent digestibility and in vitro dry matter digestibility, and the fermentable fraction of the feed. Adapter from [60]

Digestibility (%)	Additive			
	NA	CaP	CaP+Mo	CaP+Sc
ADDM	73.5 ^d	75.1 ^c	75.4 ^b	76.6 ^a
IVDMD	66.4 ^b	67.9 ^{ab}	70.1 ^{ab}	71.3 ^a
IVDGP	66.5 ^d	68.1 ^c	69.1 ^b	70.8 ^a

^{a,b,c,d}Means with different literal in the same row are different ($p < 0.05$)

NA, Non-additive; CaP, Calcium propionate; Mo, Monensin; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

IVDGP= $[(Vm_{F_o} - Vm_{F_e})/Vm_{F_o}] * 100$; where Vm_{F_a} and Vm_{F_e} are maximum volumen (mL g⁻¹) of offered feed and feces.

We examined the previous equations; if the Vm is replaced by the volume of CH₄ produced (mL g⁻¹ DM) for each substrate (F_o , F_r , and F_e), it is feasible to estimate the potential emission of methane (PEM; daL CH₄ anim⁻¹ d⁻¹; or hL CH₄ anim⁻¹ d⁻¹). Based on this data, there is also the feasibility of extrapolating them per hectare for grazing systems (daL ha⁻¹ d⁻¹; hL ha⁻¹ d⁻¹) [79] or per group of animals per farm in the confined system (daL farm⁻¹ d⁻¹; hL farm⁻¹ d⁻¹). However, it is necessary to validate the PEM with the measurement of methane by other accepted and precise techniques such as respirometric chambers, Ventilated Hood Chambers/Head Box Systems, and sulfur hexafluoride tracer [80-82]. The implications of the PEM approach are related to its practicality, low cost, and similar conditions to animal performance and management; however, its validation requires experiments with different diets and ruminants.

CONCLUSIONS

The investigations cited in this review show the feasibility of applying the GPT to estimate four fermentable fractions of the feed: FFF, associated with the fermentation of soluble sugars; MFF, related to the fermentation of reserve polysaccharides; SFF, related to the fermentation of structural polysaccharides and, TFF, directly related to IVDMD which are expressed in units more understandable by the livestock producers (g kg^{-1} DM of the feed). In addition, the chemical volumetric determination of methane and carbon dioxide with a KOH trap can be used to generate environmental impact indicators (GWPI and EII). On the other hand, the maximum volume of gas has been used as a marker of the total fermentable fraction in the offered feed, feed refusal, and feces, and bringing together these concepts to obtain a possible SI for the TFFF and the PEM from the feed (mL g^{-1} DM), animal (daL or $\text{hL animal}^{-1} \text{d}^{-1}$), system in grazing (daL or $\text{hL ha}^{-1} \text{d}^{-1}$) or feedlot (daL or $\text{hL farm}^{-1} \text{d}^{-1}$). However, more investigations are needed to see the feasibility of these application.

Author Contributions

Conceptualization, A.E.D.R.Z. and L.A.M.R.; methodology, A.E.D.R.Z. and L.A.M.R, and G.D.M.M; investigation, A.E.D.R.Z. and L.A.M.R.; resources, L.A.M.R; writing—original draft preparation, A.E.D.R.Z., L.A.M.R., G.D.M.M., and A.A.G.; writing—review and editing, A.E.D.R.Z., L.A.M.R., G.D.M.M., P.A.M.H., L.M.V.V. and A.A.G.; supervision, L.A.M.R. and G.D.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

Not applicable

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Informed Consent Statement

Not applicable.

Data Availability Statement

Data is contained within the article.

Acknowledgments

CONACYT granted a graduate fellowship to one of the authors (Ph. D. candidate Asael Edem De la Rosa-Zariñana, CVU: 589612)

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Osuga, I.M.; Njeru, D.G.; Musalia, L.M.; Shaukat, A.S. The Nutritive Value and Palatability of Selected Browse Forages Mixtures from Arid and Semi-Arid Area of Kenya When Fed to Growing Small East African Goats. *J. Agric. Vet. Sci.* **2020**, *13*(3), 01-07. DOI: 10.9790/2380-1303020107.
2. Varel, V.H.; Kreikemeier, K.K. Comparison of in vitro and in situ digestibility methods. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 578-582. <https://doi.org/10.2527/1995.732578x>.
3. Khan, M.A.; Mahr-Un-Nisa, S.M. Techniques Measuring Evaluation of Feeds Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. *Int. J. Agric. Biol.* **2003**, *5*, 91–94.
4. Graham, H.; Åman, P.A. Comparison between degradation in vitro and in sacco of constituents of untreated and ammoniatreated barley straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1984**, *10*, 199-211.
5. Tobal, C.F. Evaluación de los alimentos a través de los diferentes métodos de digestibilidad. Universidad de la Pampa **1999**, pp. 94-126.
6. Giraldo, L.A.; Gutiérrez, L.M.; Rúa, C. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Rev. Colomb. de Cienc. Pecu.* **2007**, *20*, 269-279.
7. Khan, M.A.; Mahr-Un-Nisa, S.M. Techniques Measuring Evaluation of Feeds Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. *Int. J. Agric. Biol.* **2003**, *5*, 91–94.
8. Posada, R.R. Comparación de dos métodos in vitro para estimar la digestibilidad de pastos tropicales en rumiantes. *CITECSA.* **2011**, *2*, 13-25.
9. Menke, K.E.; Steingass, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development.* **1988**, *27*, 7-55.
10. Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllan, A.B.; France, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **1994**, *48*, 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)

11. Tilley, J.M.; Terry, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* **1963**, *18*, 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
12. Goering, H.K.; Van Soest, P.J. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C. **1970**. Available online <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF> (accessed on 26 February 2020).
13. Storm, I.M.; Hellwing, A.L.F.; Nielsen, N.I.; Madsen, J. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals* **2012**, *2*, 160-183. doi:10.3390/ani2020160
14. Hill, J.; McSweeney C.; Wright, A.D.G.; Bishop-Hurley, G.; Kalantar-zadeh, K. Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends. Biotechnol.* **2016**, *34*, 26-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>
15. Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1998**, *72*, 261-281.
16. López, S.; Dhanoa, M.S.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Kebreab, E.; France, J. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *135*, 139-156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.005>.
17. Bruni, M.A.; Chilibróste, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivo Latinoamérica Producción Animal* **2001**, *9*, 43-51.
18. Posada, S.L.; Noguera, R.R. Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livest. Res. Rural. Dev.* **2005**, *17*, 12-19.
19. Groot, J.C.J.; Cone, J.W.; Williams, B.A.; Debersaques, F.M.A.; Lantinga, E.A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1996**, *64*, 77-89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)
20. Noguera, R.R.; Saliba, E.O.; Mauricio, R.M. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock. Res. Rural. Develop.* **2004**, *16* (11). Available online <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.htm> (accessed on 01 May 2023).
21. Vargas, J.; Pabón, M.; Carulla, J. In vitro methane production in the incubation of mixtures of grasses and legumes from colombian high-altitude áreas. *Arch. de Zootec.* **2014**, *63*, 397-407.
22. Elghandour, M.M.Y.; Vázquez, J.C.; Salem, A.Z.M.; Kholif, A.E.; Cipriano, M.M.; Camacho, L.M.; Márquez, O. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces*

- cerevisiae. *J. Appl. Anim. Res.* **2017**, 45, 389-395. DOI: 10.1080/09712119.2016.1204304.
23. Méndez, M.E.; Cisneros, G.; Cruz, M.R.G.; Miranda, L.G.C.; Díaz, R.M.; Ramírez, L.C.; Jiménez, G.J.; García, G.M.; Núñez, L.M.; Rayas, A.A. Effect of feeding level on in vitro methane gas production. *Agroproductividad* **2018**, 11:77-81. DOI: 10.32854/agrop.v11i11.1287
 24. Newbold, C.J.; McEwan, N.R.; De la Fuente, G.; Belanche, A.; Ramos-Morales, E. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 1-14. Doi:0.3389/fmicb.2015.01313
 25. Firkins, J.L.; Yu, Z.; Par, T.; Plank, J.E. Extending Burk Dehority's Perspectives on the Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* **2020**, 11,1-17. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00123
 26. Clergue, C.S.A.; Depenbrock, C.S.A.; Chigerwe, M. Effect of sample volume and time on rumen juice analysis in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **2022**, 2023;1–9. DOI: 10.1111/jvim.16697
 27. McBee, R.H. Manometric Method for the Evaluation of Microbial Activity of Rumen with Application to Utilization of Cellulose and Hemicelluloses. *Appl. Microbiol.* **1953**,1,106-110. Doi:10.1128/am.1.2.106-110
 28. El-Shazly, K.; Hungate, R.E. Fermentation capacity as a measure of net growth of rumen microorganisms. *Appl. Microbiol.* **1965**, 13, 62-69.
 29. Wilkins, J.R. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* **1974**, 27, 135-140.
 30. Czerkawski, J.W.; Breckenridge, G. New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Development and testing of inhibitors in vitro. *Br. J. Nutr.* **1975**, 34, 429-446.
 31. Menke, K.H.; Raab, L.; Salewsk, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; Schneider, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* **1979**, 93, 217-222.
 32. Beuvink, J.W.M.; Spoelstra, S.F.; Hogendorp, R.J. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *NJAS-WAGEN. J. Life. SC.* **1992**, 40, 401-407.
 33. Pell, A.N.; Schofield, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* **1993**. 76, 1063-1073.
 34. ANKOM RF Gas Production System. Operator's Manual. ANKOM TECHNOLOGY. **2012**. Available online <https://www.ankom.com/product-catalog/ankom-rf-gas-production-system> (accessed on 01 May 2023).
 35. Torres-Fraga, K.; Páez-Lerma, J.; Pámanes-Carrasco, G.; Herrera-Torres; Carrete-Carreón, F., Murillo-Ortiz, M. Substitution of garlic leaves to alfalfa hay and its effect on in vitro ruminal fermentation. *Abanico Veterinario* **2020**, 10, 1-11.

36. Arce-Ramírez, W.; Rojas-Bourrillon, A.; Campos-Granados, C.M. Determinación del contenido energético de materiales forrajeros a través de la relación entre la técnica de producción de gas in vitro y la ecuación mecanicista del NRC (2001). *Nutrición Animal Tropical* **2020**, *14*, 13-35.
37. Guevara-Mesa, A.L.; Miranda-Romero, L.A.; Ramírez-Bribiesca, J.E.; González-Muñoz, S.S.; Crosby-Galvan, M.M.; Hernández-Calva, L.M., Del Razo-Rodríguez, O.E. Protein Fractions and In Vitro Fermentation of Protein Feeds for Ruminants. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. **2011**, *14*, 421-429.
38. Okon, P.; Bachmann, M.; Wensch-Dorendorf, M., Titze, N., Rodehutschord, M., Rupp, C.; Susenbeth, A.; Greef, J.M.; Zeyner, A. Feed Clusters According to In Situ and In Vitro Ruminant Crude Protein Degradation. *Animals* **2023**, *13*, 224. doi.org/10.3390/ani13020224
39. Hanlon, M.E.; Simoni, M.; Moorby, J.M.; Righi, F.; Tsiplakou, E.; Kantas, D.; Foskolos, A. Effects of the addition of non-fibre carbohydrates with different rumen degradation rates in dairy cow high-forage diets using the Rumen Simulation Technique. *Animal* **2023**, *17*, 100732. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100732>
40. Valizadeh, A.M.; Kazemi-bonchenari, M.; Khodaei-Moradi, M.; Salem, H.A. Effects of different rumen undegradable to rumen degradable protein ratios on performance, ruminal fermentation, urinary purine derivatives, and carcass characteristics of growing lambs fed a high wheat straw-based diet. *Small Rumin. Res.* **2021**, *197*, 106330. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106330>
41. Syamsi, A.N.; Ifani, M. Rumen Fermentation Profiles of Protein-Energy Synchronization IndexBased Ration: an In Vitro Study. *JITV*. **2023**, *28*, 22-33.
42. Albores-Moreno, S.; Alayón-Gamboa, J.A.; Miranda-Romero, L.A.; Jiménez-Ferrer, G.; Ku-Vera, J.C.; Vargas-Villamil, L. Nutritional composition, in vitro degradation and potential fermentation of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (acahual) of deciduous forest. *J. Anim. Plant. Sci.* **2018**, *28*, 1263-1275.
43. Albores-Moreno, S.; Alayón-Gamboa, J.A.; Miranda-Romero, L.A.; Alarcón-Zúñiga, B.; Jiménez-Ferrer, G.; Ku-Vera, J.C.; Piñeiro-Vázquez, A.T. Effect of supplementation with tree foliage on in vitro digestibility and fermentation, synthesis of microbial biomass and methane production of cattle diets. *Agroforest Syst.* **2020**, *94*, 1469–1480. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00416-1>
44. Miranda-Romero, L.A.; Tirado-González, D.N.; Tirado-Estrada, G.; Améndola-Massiotti, R., Sandoval-González, L.; Ramírez-Valverde, R.;

- Salem, A.Z. Quantifying non-fibrous carbohydrates, acid detergent fiber and cellulose of forage through an in vitro gas production technique. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, 100, 3099-3110. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10342>
45. Ramírez-Díaz, R.; Pinto-Ruiz, R.; Guevara-Hernández, F.; Venegas-Venegas, J.A.; Reyes-Sosa, M.B.; Miranda-Romero, L.A. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas in vitro. *Rev. Fac. Agron.* **2021**, 38, 680-690. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v38.n3.12](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v38.n3.12).
 46. Díaz, E.V.F.; Sánchez, A.; Albores-Moreno, S.; Lara, L.A.; Valencia-Salazar, S.; Ku-Vera, J.C.; Alayon-Gamboa, J.A. Valoración nutricional y fermentación in vitro de mezclas de follaje de árboles con harina de yuca en dietas para borregos. *Acta Univ.* **2023**, 33, 3558. <http://doi.org/10.15174.au.2023.3558>
 47. Miranda-Romero, L.A.; Sandoval-González, L.; Améndola-Massiot, R. Producción de gas como método para estimar in vitro la concentración de carbohidratos fermentables en rumen. In Proceedings of the XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de producción animal and XL Congreso de la sociedad chilena de producción animal. Puerto Varas, Chile. 9-13 November **2015**, 146p.
 48. Miranda-Romero, L.A.; Vázquez-Mendoza, M.P.; Améndola-Massioti, R.; Sandoval-González-Ortiz, L.; González, R. Cuantificación de las fracciones fermentables de alfalfa y tuna por la técnica de producción de gas. In Proceedings of the XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de producción animal and XL Congreso de la sociedad chilena de producción animal. Puerto Varas, Chile. 9-13 November **2015**, 146p.
 49. Ortiz-Colín, P.; Albores-Moreno, S.; Alayon-Gamboa, J.A.; Candelaria-Martínez, B.; Miranda-Romero, L.A.; Ku-Vera, J.C.; Jiménez-Ferrer, G.; Piñeiro-Vázquez, A.T.; Albores-Moreno, A.; Díaz-Jiménez, L.E.; Ramírez-Velasco, F.; Gómez-Gutiérrez, J.E.; Díaz-Montes, A.V.; 2019. Cinética de degradación in vitro y digestibilidad de veinte especies arbóreas forrajeras de acahuales de selva baja caducifolia. *Agroecosistemas tropicales: conservación de recursos naturales y seguridad alimentaria*. Edition; Cetzal-Ix, W.; Casanova-Lugo, F.; Chay-Canul, A.J.; Martínez-Puc, J.F. Eds.; Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Chiná e Instituto Tecnológico de la Zona Maya: México; **2019**, pp. 533, ISBN (in process).
 50. Mendoza, M.G.D.; Ramos, J.A.; Aranda, E.I.; Ricalde, V.; Pérez, P.; Nájera, S. Importancia de la adherencia microbial en la determinación de la degradabilidad ruminal del nitrógeno in situ de forrajes. *Agrociencia* **1992**, 2, 295-305.

51. Vazquez-Mendoza, P.; Miranda-Romero, L.A.; Aranda-Osorio, G.; Burgueño-Ferreira, J.A.; Salem, A.Z.M. Evaluation of eleven Mexican cultivars of prickly pear cactus trees for possibly utilization as animal feed: in vitro gas production. *Agroforest Syst.* **2017**, 91, 749–756. DOI 10.1007/s10457-016-9947-6.
52. González-Ortiz, R. *Ensilaje de alfalfa (Medicago sativa L.) y ovillo (Dactylis glomerata L.) en contenedores de 200 litros durante la época de lluvias*; Master's Thesis, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, México, **2012**.
53. Villegas-Castañeda M.; Meneses-Mayo, M.; Miranda-Romero, L.A.; Loera-Corral, O. In vitro gas production and dry matter disappearance of solid culture with ligninolytic fungi. *Agrociencia* **2010**, 4, 917-929.
54. Elmasry, A.M.A.; Mendoza, G.D.; Miranda, L.A.; Vázquez, G.; Salem, A.Z.M.; Hernández, P.A. Effects of types and doses of yeast on gas production and in vitro digestibility of diets containing maize (*Zea mays*) and lucerne (*Medicago sativa*) or oat hay. *S. Afr. J. Anim.* **2016**, 46, 391-397. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v46i4.7>
55. Sandoval-González, L.; Miranda-Romero, L.A.; Lara-Bueno, A.; Huerta-Bravo, M.; Uribe-Gómez, M.; Martínez-Martínez, M. In vitro fermentation and the correlation of the nutritional content of leucaena associated with star Grass. *Rev. Mexicana. Cienc. Agric.* **2016**, 16, 3185-3196. doi.org/10.29312/remexca.v0i16.388
56. Minor-Hinojosa, T.I. *Evaluación in vitro e in situ de combinaciones de forraje y concentrado en dietas para vacas Holsteín*. Master's Thesis, Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Posgraduados, México, **2017**.
57. Vega-Hernández, F.J.; *Hora de corte y henificado en las fracciones fermentables de alfalfa-pasto ovillo*. Bachelor's Thesis, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México, **2017**.
58. Miranda-Romero, L.A.; Vazquez, M.P.; Burgueño, F.; Aranda-Osorio, G. Nutritive value of cactus pear silages for finishing lambs. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2018**, 20, 196-215.
59. Martínez-Hernández, B.E. *Indicadores de calentamiento global, selectividad y aprovechamiento de la dieta mediante la producción de gas*. Master's Thesis, Posgrado de Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, México, **2019**.
60. Miranda-Romero, L.A.; Hernández-Aguirre, M.T.; Buendía-Rodríguez, G.; Castrejón-Pineda, F.A.; Corona-Gochi, L. Propionato, monensina y *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación in vitro y la emisión potencial de gases por becerros Holstein. In Proceedings of the XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria. Oaxaca, México, 16 -18 October **2019**.

61. Patra, A.K. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Front. Vet. Sci.* **2016**, 3, 39. DOI: 10.3389/fvets.2016.00039
62. Danielsson, R.; Ramin, M.; Bertilsson, J.; Lund, P.; Huhtanen, P. Evaluation of a gas in vitro system for predicting methane production in vivo. *J. Dairy Sci.* **2017**, 100, 8881-8894. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12675>
63. Torres-Fraga, K.; Páez-Lerma, J.; Pámanes-Carrasco, G.; Herrera-Torres, E.; Carrete-Carreón, F.; Murillo-Ortiz, M. Substitution of garlic leaves to alfalfa hay and its effect on in vitro ruminal fermentation. *Abanico Veterinario*. **2020**, 10,1-11.
64. Camacho-Escobar, M.A.; Galicia-Jiménez, M.M.; Sánchez-Bernal, E.I.; Ávila-Serrano, N.Y.; López-Garrido, S.J. Producción de metano y bióxido de carbono in vitro de pastos tropicales de la costa de Oaxaca, México. *Terra Latinoamericana*. **2020**, 38, 425-434.
65. Iweka, S.C.; Owuama, K.C. Biogas Yielding Potential of Maize Chaff Inoculated with Cow Rumen and Its Characterization. *Journal of Energy Research and Reviews*. **2020**, 6, 34-50.
66. McArthur, J.M.; Miltimore, J.E. Rumen gas analysis by gas-solid chromatography. *Can. J. Anim. Sci.* **1961**, 41, 187-196.
67. Fieves, V.; Babayemi, O.J.; Demeyer, D. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2005**, 123, 197-210.
68. Ramírez-Díaz, R.; Pinto-Ruiz, R.; Guevara-Hernández, F.; Venegas-Venegas, J.A.; Reyes-Sosa, M.B.; Miranda-Romero, L.A. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas in vitro. *Rev. Fac. Agron.* **2021**, 38, 680-690. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v38.n3.12](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v38.n3.12)
69. Lara-Bueno, A.; Avendaño-Díaz, J.A.; Méndez-Becerra, P.; Miranda-Romero, L.A.; Orzuna-Orzuna, J.O. Digestibilidad y gases de efecto invernadero in vitro de leucaena leucocephala y cynodon nlemfuensis en diferentes proporciones. In Proceedings of the XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, Oaxaca, México. 16-18 October **2019**. pp. 831-838.
70. Ramírez-Díaz, R.; Chacón-Vázquez, A.; Pinto-Ruiz, R.; Miranda-Romero, L.A.; Guevara-Hernández, F.; Medina-Jonapá, F.; Raj-Aryal, D. Metano e índices de emisión de gases por la técnica de producción de gas in vitro. In Proceedings of the XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, Oaxaca, México. 16-18 October **2019**. pp.1316-1319.
71. Church, D.C.; Pond, W.G.; Pond, K.R. *Nutrición y alimentación de animales*. Ed. Limusa; México, **2007**; pp. 635.

72. Shimada, M.A. Nutrición animal. Ed. Trillas; México, **2009**; pp. 397.
73. Erdem, F.; Cetinkaya, N.; Nisbet, C.; Altin, E. Estimation of organic matter digestibility, metabolizable energy, phenolic compounds and antioxidant activity of stems and seeds of the *Juncus acutus* plant in ruminant nutrition. *S. Afr. J. Anim.* **2015**, *45*, 502-509. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v45i5.7>
74. Olfaz, M.; Kilic, U.; Boga, M.; Abdi, A.M. Determination of the In Vitro Gas Production and Potential Feed Value of Olive, Mulberry and Sour Orange Tree Leaves. *Open. Life. Sci.* **2018**, *13*, 269–278. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0033>
75. García-Rodríguez, J.; Ranilla, M.J.; France, J.; Alaiz-Moretón, H.; Carro, M.D.; López, S. Chemical Composition, In Vitro Digestibility and Rumen Fermentation Kinetics of Agro-Industrial By-Products. *Animals* **2019**, *9*, 861. <http://dx.doi.org/10.3390/ani9110861>
76. Chávez, H.G.; Martínez, L. *Producción de gas in vitro como método para determinar la asimilación de dietas por corderos*. Bachelor's Thesis. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México, **2014**, 55 p.
77. Miranda-Romero, L.A.; Martínez-Hernández, B.E.; Salvador-Flores, O. La técnica de producción de gas como método para estimar la selectividad y aprovechamiento del alimento por corderos. In Proceedings of the XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, Oaxaca, México. 16-18 October **2019**, pp. 632-637.
78. Miranda-Romero, L.A.; Vega-Hernández, F.J.; Améndola-Massioti, R.D.; Aranda-Osorio, G.; Pelayo, P.T.; Córdoba-Álvarez, M. Henificado y hora de corte de alfalfa-pasto ovillo en las fracciones fermentables estimadas con la técnica de producción de gas. In Proceedings of the XXVI Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, Guayaquil, Ecuador. 28-31 May **2018**.
79. Anaya-Plata, B. *Caracterización alimenticia de dos sistemas de producción en pastoreo mediante la técnica de producción de gas*. Master's Thesis, Posgrado de Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. **2017**.
80. Place, S.E.; Pan, Y.; Zhao, Y.; Mitloehner, F.M. Construction and operation of a ventilated hood system for measuring greenhouse gas and volatile organic compound emissions from cattle. *Animals* **2011**, *1*, 433-446.
81. Hammond, K.J.; Crompton, L.A.; Bannink, A.; Dijkstra, J.; Yáñez-Ruiz, D.R.; O'Kiely, P.; Schwarm, A. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *219*, 13-30.
82. Zhao, Y.; Nan, X.; Yang, L.; Zheng, S.; Jiang, L.; Xiong, B. A Review of Enteric Methane Emission Measurement. Techniques in Ruminants. *Animals* **2020**, *10*, 1004.

CAPÍTULO 3. NIVEL DE PROTEÍNA Y ENERGÍA EN LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS PARA BORREGOS

Level of protein and energy on the *in vitro* fermentation of diets for lambs

Asael Edem De la Rosa-Zariñana¹, Luis Alberto Miranda-Romero^{1*}, Pedro Arturo Martínez-

Hernández¹, Luis Manuel Vargas-Villamil², Amr Elmasry³

¹Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Km. 38.5 Carretera México - Texcoco Chapingo, CP. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Posgrado en Ciencias Agrícolas en el Trópico, Colegio de Posgraduados campus Tabasco.

Periférico Carlos A. Molina S/N Km. 3, Ranchería Río Seco y Montaña, CP. 86500. Heroica Cárdenas, Tabasco, México.

³Botany Department, Faculty of Agriculture, Menoufia University. Shibin El-Kom 32514, Egypt.

*Autor de correspondencia: microbiología.pecuaria08@gmail.com

RESUMEN

La eficiencia de utilización ruminal del alimento, entre otras razones, depende del nivel de energía y proteína contenida en el mismo. Con el objetivo de determinar el efecto del nivel de energía y proteína del alimento en la digestibilidad (DIVMS_{72h}), el volumen (Vm), tasa (S) y fase Lag (L) de la producción de gas; las fracciones de fermentación rápida (FFR), media (FFM) y lenta (FFL); la producción de metano, el indicador del potencial de calentamiento global (IPCG) e índice de

impacto ambiental (IIA), se formularon cinco dietas de acuerdo al nivel de energía metabolizable (EM, Mcal kg⁻¹ MS) y proteína cruda (PC, %); tres balanceadas a nivel bajo (BB; 2.6 y 13.8), medio (MM; 2.8 y 16) y alto (AA; 3.0 y 17.2); y dos desbalanceadas (AB, 2.8 y 14.5; BA, 2.6 y 17.2) en EM y PC. La S fue superior ($p<0.05$) en las dietas con mayor contenido de energía (AA, AB), el Vm fue menor ($p<0.05$) para la dieta BA. La dieta AA tuvo las mayores ($p<0.05$) FFR y FFM. Las dietas BA y BB tuvieron la mayor ($p<0.05$) FFL, pero menor DIVMS_{72h} ($p<0.05$). Respecto al impacto ambiental, la dieta BB produjo la mayor proporción ($p<0.05$) de CH₄ y por consiguiente el mayor ($p<0.05$) IPCG e IIA. Se concluye que las dietas con contenido mayor de carbohidratos no estructurales tienen mejor cinética fermentativa y digestibilidades, también generan menores proporciones de CH₄, IPCG y IIA, estos últimos pueden usarse como indicadores del impacto ambiental ya que consideran las cantidades de CO₂ y CH₄ producidos por los consorcios microbianos del rumen.

Palabras clave: digestibilidad, engorda intensiva, fracciones fermentables, impacto ambiental, técnica de producción de gas.

ABSTRACT

The ruminal utilization efficiency of the feed, among other reasons, depends on the level of energy and protein it contains. To determine the effect of the protein and energy levels of diet on digestibility (DIVMS_{72h}), the volume (Vm), rate (S) and Lag phase (L) of gas production; the rapid (RFF), medium (MFF) and slow (SFF) fermentation fractions; methane production, global warming potential indicator (GWPI) and environmental impact index (EII). Five diets were formulated according to the level of metabolizable energy (ME, Mcal kg⁻¹ DM) and crude protein (CP, %). Three were balanced at low level (BB; 2.6 y 13.8), medium (MM; 2.8 y 16) and high (AA; 3.0 y 17.2); and

two were unbalanced (AB, 2.8 y 14.5; BA, 2.6 y 17.2) in EM and PC. The S was higher ($p < 0.05$) in the diets with higher energy content (AA, AB), the Vm was lower ($p < 0.05$) for the BA diet. The AA diet had the highest ($p < 0.05$) FFR and FFM. The BA and BB diets had the highest ($p < 0.05$) FFL, but the lowest IVDM72h ($p < 0.05$). Regarding the environmental impact, the BB diet produced the highest proportion ($p < 0.05$) of CH₄ and therefore the highest ($p < 0.05$) WGPI and EII. It is concluded that diets with a higher content of non-structural carbohydrates have better fermentative kinetics and digestibilities, they also generate lower proportions of CH₄, GWPI, and EII, the latter can be used as indicators of environmental impact since they consider the amounts of CO₂ and CH₄ produced by rumen microbial consortia.

Key words: digestibility, intensive fattening, fermentable fractions, environmental impact, and gas production technique.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción intensiva, el uso de concentrado en las raciones para la engorda de ovinos es cada vez mayor (Arjmand *et al.* 2022, Hernández-de los Santos *et al.* 2022) y, en consecuencia, los costos de alimentación son mayores debido al alza del precio del maíz y sorgo, el cual incrementa año con año (Mestra *et al.* 2020, Velázquez-Duarte *et al.* 2022). El problema se agudiza cuando las dietas comerciales y balanceadas son utilizadas deficientemente por el rumiante (Martínez *et al.* 2007, Salinas-Chavira *et al.* 2011, Chiriguay 2023). El nivel de energía y proteína en el alimento es determinante en la respuesta productiva y la eficiencia de utilización del alimento por los rumiantes (De Azevedo *et al.* 2021, Sileshi *et al.* 2021, Kazemi-Bonchenari *et al.* 2022), relacionadas con la eficiencia en la fermentación microbiana ruminal. En este sentido, es importante evaluar el efecto del nivel de energía y proteína de dietas formuladas para la engorda

intensiva de borregos en la actividad fermentativa de los consorcios microbianos del rumen. En estos sistemas el contenido de EM y PC fluctúan entre 2.4 y 2.8 Mcal kg⁻¹, y de 14 a 16% (NRC 2007), con lo cual se espera una ganancia diaria de peso (GDP) de 250 a 300 g día⁻¹.

Por otro lado, la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG) es un procedimiento práctico que permite estimar indirectamente la extensión y cinética de fermentación de los alimentos (Aragadvay-Yungán *et al.* 2022). El gas derivado de la fermentación ruminal *in vitro* está relacionado principalmente, pero no exclusivamente, con el contenido de carbohidratos fermentables no estructurales (azúcares solubles y almidón) y estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) del alimento (Murillo *et al.* 2012, Tirado-González *et al.* 2016, Villalba *et al.* 2021), la producción de ácidos grasos volátiles (Huertas-Molina *et al.* 2020) y, por lo tanto, con el contenido de energía del alimento y la síntesis de biomasa microbiana (Opatpatanakit *et al.* 1994, Schofield *et al.* 1994, Castillo-López y Domínguez-Ordóñez 2019, Gutiérrez-Fidencio *et al.* 2023). Al respecto, Miranda-Romero *et al.* (2020), propusieron la aplicación de la TPG para estimar, no solo la extensión y cinética de fermentación del alimento, sino también las fracciones de fermentación rápida, media y lenta, asociadas a carbohidratos solubles, almidón y celulosa; así como para estimar indicadores de impacto ambiental como la producción de metano, el indicador del potencial de calentamiento global (IPCG) y el índice de impacto ambiental (IIA) (Martínez-Hernández *et al.* 2019). Cui *et al.* (2019), hallaron que el nivel de energía y proteína de la dieta tiene efecto en la composición e interacciones de la comunidad microbiana ruminal, lo cual puede tener importancia para definir estrategias en el uso óptimo de nutrientes. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2020) discuten en su experimento que una adición adecuada de *Urtica cannabina* a *Leymus chinensis* puede mejorar el balance de energía y proteína para promover la reproducción de los microorganismos del rumen. Por ende, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del nivel de

energía metabolizable y proteína cruda de dietas dentro del intervalo para la engorda intensiva de ovinos, en la digestibilidad, cinética de fermentación, fracciones fermentables e indicadores de impacto ambiental *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y tratamientos. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Los tratamientos consistieron en cinco dietas de acuerdo con el contenido de energía metabolizable (EM, Mcal kg⁻¹MS) y proteína cruda (PC, %); tres balanceadas a nivel bajo (BB; 2.6 y 13.8), medio (MM; 2.8 y 16) y alto (AA; 3.0 y 17.2); y dos desbalanceadas (AB, 2.8 y 14.5; BA, 2.6 y 17.2) en EM y PC (NRC, 2007). A las dietas se les determinó el contenido de proteína cruda (PC), cenizas (Ce), extracto etéreo (EE) y materia seca (MS) (AOAC 1990); así como la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.* 1991). La composición de las dietas se presenta en la Tabla 1.

Cinética de la producción de gas de fermentación, degradación de la materia seca y fracciones fermentables *in vitro*. La fermentación de las dietas se midió indirectamente por TPG (Menke y Steingass 1988, Theodorou *et al.* 1994), para lo cual en frascos de vidrio color ámbar de 125 mL de capacidad, se colocaron 500 mg de MS de cada dieta, 90 mL de inóculo ruminal y, simultáneamente, un flujo continuo de CO₂. Los frascos fueron tapados herméticamente con un tapón de goma y aro de aluminio, e incubados en baño María a 39 °C.

Posteriormente, se midió la presión generada por el gas de fermentación, con manómetro de 0.0 a 1.0 kg cm⁻² de capacidad (METRON®, 51100) a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación. Los valores de presión se transformaron a volumen de gas (V; mL g⁻¹ MS)

de acuerdo con el modelo de regresión lineal $V \text{ (mL)} = \frac{P \text{ (kg cm}^{-2}\text{)} + 0.0495}{0.0185}$, el cual se obtuvo relacionando la presión (P) generada por volúmenes conocidos de aire inyectado a los frascos mantenidos en las mismas condiciones de manejo. Al final del periodo de incubación, el contenido residual de los frascos se filtró a través de papel filtro previamente pesado, se secó a 65 °C por 48 h en estufa de aire forzado y se pesó para obtener la materia seca residual del alimento por diferencia de peso. La metodología para la determinación de la producción de gas de fermentación se repitió dos veces en el tiempo.

El inóculo ruminal se obtuvo de novillos en ayuno por 12 h canulados en rumen y adaptados a una dieta de mantenimiento (70:30% de F:C), bajo la norma de cuidado animal NOM-062-ZOO (SAGARPA 2001). La muestra de contenido ruminal fue transportada inmediatamente en un termo al laboratorio y se filtró a través de cuatro capas de tela de gasa y se mezcló con una solución mineral reducida en una proporción 1:9 (v/v). Cada litro de solución mineral contenía K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.90 g), MgSO₄ (0.18 g), CaCl₂ (0.12 g), Na₂CO₃ (4 g), la cual fue reducida con 20 mL L⁻¹ de una solución compuesta de Na₂S (0.2 g) y L-cisteína (0.2 g) disueltas en solución de NaOH (0.8 mL L⁻¹). Como indicador de la reducción, se adicionaron dos gotas de rezarzurina al 0.1% p/v (Miranda-Romero *et al.* 2020).

El volumen de gas acumulado en función del tiempo de incubación se usó para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo (V_m; mL g⁻¹ MS), tasa (S; mL h⁻¹) y fase lag (L; h), del modelo logístico $V_0 = V_m / (1 + e^{(2-4k(t-L))})$ (Schofield *et al.* 1994) y el procedimiento NLIN (SAS 2015).

La digestibilidad *in vitro* de la MS a 72 h (DIVMS_{72h}) se calculó con la MS inicial adicionada a cada frasco y la MS residual obtenida por filtración, usando la siguiente formula:

$$DIVMS72h = \frac{MS_{inicial} - MS_{residual}}{MS_{inicial}} * 100$$

El volumen acumulado de gas se utilizó también para calcular las fracciones fermentables de acuerdo con el siguiente procedimiento: se obtuvieron los volúmenes fraccionales (V_f) de gas acumulado para los intervalos de 0 a 8 (V_{f0-8h}), 8 a 24 (V_{f8-24h}) y de 24 a 72 ($V_{f24-72h}$) horas de incubación (Miranda-Romero *et al.* 2020). Con estos volúmenes fraccionales de gas se obtuvo el porcentaje de la fracción de fermentación rápida (% FFR), media (% FFM) y lenta (% FFL) en relación con el volumen total de gas a 72 h de incubación.

Indicadores de impacto ambiental. Otra muestra de MS de cada dieta se fermentó *in vitro*, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones: la incubación se llevó a 39 °C por 24 horas en baño María, la medición del volumen de gas (V) se realizó a 0, 6, 12, 18 y 24 h de incubación con una jeringa de vidrio de 50 mL de capacidad. En cada medición, el gas atrapado en la jeringa se transfirió cuidadosamente a otro frasco de 60 mL de capacidad cerrado herméticamente con tapón de goma y aro de aluminio, que contenía 45 mL de una solución de KOH (1 M) para capturar el dióxido de carbono (CO_2) de la mezcla de gases, para después medir el volumen de gas que retornó a la jeringa, el cual correspondió a la cantidad de metano más gases menores (V_{CH4+GM}). Los valores de V_{CH4+GM} se ajustaron a metano teórico (V_{CH4}) con el factor de 0.77, de acuerdo con la proporción de metano determinada en la muestra de gas generado en el rumen (Zhong *et al.* 2016). La diferencia del V menos el V_{CH4+GM} correspondió al volumen de CO_2 (V_{CO2}). Este procedimiento se repitió dos veces en el tiempo y los valores de V , V_{CH4+GM} , V_{CO2} y V_{CH4} se expresaron en % y $mL\ g^{-1}\ MS$ en 24 horas de incubación. Los valores de V_{CO2} y V_{CH4} se utilizaron para calcular el IPCG ($mL\ CO_2\ eq\ g^{-1}\ MS$) de acuerdo con la siguiente ecuación: $IPCG = [CO_2\ (mL\ g^{-1}MS) + CH_4\ (mL\ g^{-1}MS) * 23]$; donde la constante 23

corresponde a los equivalentes de CO₂ para el CH₄ (Berra *et al.* 2009, Paredes 2022). Mientras que los valores del IPCG y V se utilizaron para calcular el IIA (CO₂ eq) de acuerdo con la siguiente relación: $IIA = \frac{IPCG}{VT}$

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño experimental de bloques generalizados con cinco tratamientos y seis repeticiones de tratamiento en cada bloque. El bloque correspondió a la repetición en el tiempo y los tratamientos (MM, AA, AB, BA y BB) a las dietas usadas para fermentación. Se usó el procedimiento GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (SAS 2015).

$$Y_{ijk} = \mu + r_i + \beta_j + (r\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable respuesta correspondiente al tratamiento i, bloque j y observación k, μ = media general

r_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento, $i=1, 2, \dots, 5$, β_j = efecto del j-ésimo bloque, $j=1$ y 2 , $(r\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción del bloque por tratamiento, ϵ_{ijk} = error aleatorio asociado con la k-ésima observación de la variable de respuesta en el tratamiento i y bloque j. Se asume $\epsilon_{ijk} \sim \text{NIID}(0, \sigma^2\epsilon)$.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta la composición de ingredientes alimenticios y nutrientes de las dietas usadas en la investigación. Las dietas MM y AB tuvieron la misma proporción F:C debido a que contuvieron el mismo nivel de energía (2.8 Mcal kg⁻¹ MS).

Los parámetros de la cinética de producción de gas: Vm, S y L se presentan en la Tabla 2. La fase L fue la misma ($p>0.05$) para las dietas balanceadas (AA, MM y BB) y las desbalanceadas (AB, BA) y tuvo un valor de 4.24 h. La S de producción de gas fue mayor ($p<0.05$) en las dietas

balanceadas con niveles de EM y PC medios o altos (MM, AA), en comparación con las dietas bajas en energía (BA, BB). El Vm de gas, el cual indica la extensión de la fermentación, fue menor ($p < 0.05$) en la dieta desbalanceada con exceso de proteína y deficiencia de energía (BA), con respecto a las otras dietas (Tabla 2). El Vm y L fue igual ($p > 0.05$) para las tres dietas balanceadas BB, MM y AA.

En la Tabla 3 se muestran los valores de las fracciones fermentables. La FFR y la FFM en la dieta balanceada a nivel alto de EM y PC (AA), fueron mayores ($p < 0.05$) en comparación a la dieta balanceada a niveles bajos de EM y PC (BB) y a las dietas desbalanceadas (AB y BA).

La FFR es igual ($p > 0.05$) para ambas dietas desbalanceadas (AB y BA), mientras que la FFM fue mayor ($p < 0.05$) para la dieta AB respecto a BA. Por otro lado, al comparar las dietas altas en energía (AB y AA), se observó que las FFR y FFM son menores para la dieta desbalanceada AB. La FFL fue mayor ($p < 0.05$) en las dietas bajas en energía BA y BB en comparación con las dietas MM y AA. La dieta desbalanceada con un exceso de EM y escasa cantidad de PC (AB) tuvo mayor FFL. La DIVMS_{72h}, fue mayor ($p < 0.05$) para la dieta balanceada a nivel medio MM con respecto a las dietas bajas en EM (BA y BB) o con las dietas altas en energía (AA y AB).

Los indicadores de impacto ambiental se muestran en la Tabla 4. La suma de CH₄ y CO₂ fue en promedio de 96%. La proporción de CH₄ varió ($p < 0.05$) entre tratamientos de 10.5 a 13.5%. Las dietas bajas en EM (BB y BA) produjeron el mayor porcentaje de CH₄ ($p < 0.05$) en comparación con las dietas con nivel medio o alto de EM (MM, AA y AB; Tabla 4). Por otro lado, la dieta AA produjo mayor V_{24h} ($p < 0.05$) en comparación con las dietas BA y BB. La dieta baja en EM y alta el PC (BA) tuvo el menor V_{24h} ($p < 0.05$), inclusive que la dieta balanceada a bajo nivel (BB) y la desbalanceada (AB).

Con relación al IPCG (Tabla 4), la dieta BB causó mayor ($p<0.05$) IPCG que la dieta balanceada a nivel medio (MM) y la desbalanceada deficiente en proteína (AB). Por otra parte, el IIA es un valor de comparación para estimar que tanto más un alimento impacta al ambiente con respecto a otro, y este valor está en función de la cantidad de CH_4 producida. Para esto se asumió que el volumen (V_{24h}) equivale en su totalidad a CO_2 eq. El IIA para las dietas varió entre 3.3 y 3.9 (Tabla 4). Las dietas bajas en energía (BB y BA) tienen mayor IIA ($p<0.05$) en comparación con las dietas con un contenido medio y alto en EM (MM y AB).

DISCUSIÓN

La extensión de la fermentación (V_m) y la fase Lag (L) no fueron afectadas por el nivel de EM y PC en la dieta dentro de intervalo investigado, siempre y cuando se encuentren balanceadas. El desbalance de EM y PC disminuyó la tasa (S) y el V_m de la producción de gas; en particular con la dieta BA (Tabla 2). Lo anterior se atribuyó, por un lado, al exceso de PC ya que por ser deficiente en EM la microbiota fermenta más activamente la proteína con el fin de generar suficiente ATP para sus funciones, sin embargo, este proceso produce escasa cantidad de gas (Makkar 2004) y, por otra parte, debido a que la energía es más determinante que la proteína en la fermentación ruminal, tal como se demostró *in vivo* para variables productivas (Cui *et al.* 2019) y en estudios *in situ* para la proporción de ácidos grasos volátiles (Beckett *et al.* 2021) y, por consiguiente, en la producción de gas (Karabulut *et al.* 2007). El V_m obtenido varió de 462 a 493 mL g^{-1} MS, similar a otras investigaciones en las que se fermentaron granos o dietas altas en concentrado (Bueno *et al.* 2005, Sánchez *et al.* 2019), el cual es mayor al producido por forrajes verdes y rastrojos (127 y 238 mL g^{-1} MO; Calabro *et al.* 2005). Esto es debido a que los granos y las dietas altas en concentrados

contienen mayor cantidad de carbohidratos no estructurales (azúcares solubles y almidón) en contraste a los forrajes (Bernal-Barragan *et al.* 2022).

En esta investigación, las diferencias en las fracciones de fermentación FFR y FFM entre los tratamientos, se asocian básicamente al contenido de concentrado (carbohidratos solubles y polisacáridos de reserva, no estructurales) como se aprecia en la Tabla 1 (Ruiz *et al.* 2018, Ramírez-Díaz *et al.* 2020). El incremento de concentrado en una dieta induce mayor producción de gas (Miranda-Romero *et al.* 2020). De igual forma, estos autores señalan que la FFL se relaciona con carbohidratos estructurales como la celulosa, lo cual se puede observar en dietas con alta proporción de forraje. No obstante, un desbalance con menor cantidad de PC puede ocasionar una fermentación tardía de los carbohidratos no estructurales, en virtud de que causa baja biomasa microbiana.

La cantidad de forraje incluido en las dietas fue determinante en la digestibilidad, la dieta MM con menor proporción de forraje tuvo mayor digestibilidad en comparación con las dietas con altas cantidades de fibra (BA y BB), lo que concuerda con lo observado por Gurrola *et al.* (2014). Sin embargo, la inclusión de un alto contenido de grasa para elevar el valor de energía y EE puede disminuir la digestibilidad (Harahap *et al.* 2022), aun cuando el alimento contenga alta cantidad de concentrado o carbohidratos no estructurales. De igual forma, un desbalance en el nivel de PC puede ocasionar baja digestibilidad de la dieta (Bastida-García *et al.* 2011). Lo anterior demuestra que la adición de grasa y/o el desbalance de EM y PC, como se observó para las dietas AA y AB en el experimento, pueden ocasionar que un alimento muestre alta digestibilidad, pero menor fermentabilidad, o viceversa. Inclusive si la dieta contiene ingredientes con compuestos secundarios antinutricionales (Jiménez-Santiago *et al.* 2019).

Por otro lado, el incremento de la cantidad de CH₄ tuvo una concomitante disminución de la proporción de CO₂, observado también por Culma *et al.* (2017). Los valores de CH₄ hallados en este experimento son similares a los reportados para dietas altas en granos (Martínez-Hernández *et al.* 2019). La mayor cantidad de CH₄ en las dietas con elevadas cantidades de forraje (BA y BB) se atribuye comúnmente a que tales dietas fomentan la actividad y crecimiento de las bacterias fibrolíticas del rumen, las cuales son las principales productoras de H₂ y CO₂, moléculas precursoras para la síntesis de CH₄ (Vélez-Terranova *et al.* 2014). No obstante, una deficiencia en EM y un exceso de PC puede ocasionar un mal uso ruminal del alimento en las primeras 24 h de incubación, debido a que los microorganismos deben fermentar la proteína para fines energéticos y, por consiguiente, la producción de gas es menor (Rodríguez *et al.* 2007, Phesatcha *et al.* 2022). Con respecto al IPCG, puede ser un valor más acorde al impacto ambiental relacionado al calentamiento global, que la sola medición de CH₄, ya que para el cálculo del IPCG se consideraron la producción de los dos gases de efecto invernadero mayormente producidos en el rumen (CO₂ y CH₄) y su equivalencia calorífica (Sandoval-Pelcastre *et al.* 2020). El valor de CH₄ estimado por otras metodologías, es útil para comparar el efecto de un tratamiento, pero no el impacto ambiental. El valor de metano es más bajo que el IPCG, y éste último es mayor cuanto más alto sea la producción de metano. El IPCG es un indicador del potencial de calentamiento causado por la fermentación ruminal de un gramo de MS en 24 h de incubación. Por otro lado, no hay referencias del IPCG en la literatura científica para compararlos con los encontrados en esta investigación; sin embargo, el IPCC (2006) ha calculado un indicador conocido como factor de emisión (FE) el cual se calcula con base en la energía bruta y el porcentaje de esta energía en la alimentación convertida en metano (Y_m). El FE es mayor en animales que consumen dietas bajas en energía y altas en fibra, en contraste con aquellas altas en energía y bajas en fibra, las cuales reducen el

factor de emisión (Lombardi *et al.* 2021), efecto que se corrobora mediante el IPCG medido en este experimento con las dietas BA, BB, MM y AA. El IPCG tiene la ventaja de poderse medir para cada tipo y manejo de alimento mediante la técnica de producción de gas, mientras que el FE es un valor fijo que estima de forma general el impacto en el calentamiento global.

El otro indicador propuesto en esta investigación es el IIA, como era de esperar este índice se relaciona fuertemente con la producción de metano y con el contenido de forraje y FDN del alimento. Por ejemplo, las dietas BA y BB tuvieron valores de IIA mayores que las dietas MM y AB. En general, el IIA encontrados en esta investigación, son propios de dietas altas en concentrado y EM, y se espera que cuando se usan forrajes o dietas altas en forraje su valor es sustancialmente mayor.

CONCLUSIÓN

Independiente del nivel de energía metabolizable y de proteína cruda en dietas para la engorda intensiva de ovinos, es fundamental que se encuentren balanceados con el fin de eficientizar la fermentación y digestión ruminal *in vitro*, y reducir el impacto ambiental relacionado al calentamiento global. El desbalance de estos nutrientes, en particular con exceso de proteína, ocasiona mayor valor de indicadores de impacto ambiental (IPCG, IIA, %CH₄), menores fracciones fermentables (FFR, FFM), DIVMS y menor extensión de la fermentación (V_m) del alimento.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada para sus estudios de posgrado, así como al Programa de Doctorado en Ciencias en Innovación Ganadera de la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Agricultural Chemists. Washington DC, USA. 2000p.
- Aragadvay-Yungán R, Rodríguez MB, Basantes-Basantes E, Cando AC (2022) Valor nutricional, producción de gas *in vitro* y degradación ruminal *in situ* de ensilaje de maíz enriquecido con *Saccharomyces cerevisiae*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 33: e20890-e20890. DOI: 10.15381/rivep.v33i1.20890.
- Arjmand M, Kiani A, Azizi A, Fadayifar A, Azarfar A, Ponnampalam EN (2022) Effects of dietary concentrate level and feeding length on nutrient digestibility, rumen hydrolytic enzymes activity, intermediary metabolites, and feeding behavior in growing fat-tailed lambs: Iranian feedlot system. Small Ruminant Research 217:106832. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2022.106832.
- Bernal-Barragán H, Perrusquía-Tejeida VM, Vásquez-Aguilar NC, González-Rodríguez H (2022) Determinación de la producción de gas *in vitro*, contenido de nutrientes y energía metabolizable de forrajes y suplementos para ovinos y caprinos. Ciencia UANL 115: 40-47.
- Bastida-García J, González-Ronquillo M, Dominguez-Vara I, Romero-Bernal J, Castelan-Ortega O (2011) Effect of field pea (*Pisum sativum* L.) level on intake, digestion, ruminal fermentation and *in vitro* gas production in sheep fed maintenance diets. Animal Science Journal 82: 654-662.
- Beckett L, Gleason CB, Bedford A, Liebe D, Yohe TT, Hall MB, White RR (2021) Rumen volatile fatty acid molar proportions, rumen epithelial gene expression, and blood metabolite concentration responses to ruminally degradable starch and fiber supplies. Journal of Dairy Science 104: 8857-8869.
- Berra G, Finster L, Valtorta SE (2009) Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vaca. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias 8: 49-56.
- Bueno IC, Cabral FSL, Gobbo SP, Louvandini H, Vitti DM, Abdalla AL (2005) Influence of inoculum source in a gas production method. Animal Feed Science and Technology 123: 95-105.
- Calabro S, López S, Piccolo V, Dijkstra J, Dhanoa MS, France J (2005) Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. Animal Feed Science and Technology 123: 51-65.
- Castillo-López E, Domínguez-Ordóñez MG (2019) Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 10: 120-148.

- Chiriguay BWG (2023) Modelo matemático de optimización alimenticia para la eficiencia productiva del ganado vacuno en el Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 7: 9162-9177.
- Cui K, Qi M, Wang S, Diao Q, Zhang N (2019) Dietary energy and protein levels influenced the growth performance, ruminal morphology and fermentation and microbial diversity of lambs. *Scientific Reports* 9: 16612. DOI: 10.1038/s41598-019-53279-y.
- Culma NYM, de Jesús RG, Suárez NEA, Herrera FV (2017) Alternativas nutricionales para disminuir emisiones de gas metano por bovinos y su efecto en el calentamiento global. *Ciencias Agropecuarias* 3: 8-17.
- De Azevedo EB, Savian JV, do Amaral GA, de David DB, Gere JI, Kohmann MM, de Faccio CPC (2021) Feed intake, methane yield, and efficiency of utilization of energy and nitrogen by sheep fed tropical grasses. *Tropical Animal Health and Production* 53(5): 452. DOI: 10.1007/s11250-021-02928-4.
- Gurrola AG, Hernández MP, Duran RR, Ramírez JCR, Gurrola JAG, Mormita MG, García LS (2014) Efecto de la inclusión del fruto de *Guazuma ulmifolia* como sustituto de maíz en la dieta sobre el comportamiento productivo y rendimiento en canal de ovinos Pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17: 215-222.
- Gutiérrez-Fidencio M, Crosby-Galván MM, Ramírez-Bribiesca JE, Sánchez-Villarreal A, Hernández-Rodríguez M, López-Rosas I, Ramírez-Mella M (2023) Efecto del rizoma de *Zingiber officinale* sobre la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(1): e3570. DOI: 10.19136/era.a10n1.3570.
- Harahap RP, Suharti S, Ridla M, Laconi EB, Nahrowi N, Irawan A, Jayanegara A (2022) Meta-analysis of dietary chitosan effects on performance, nutrient utilization, and product characteristics of ruminants. *Animal Science Journal* 93(1): e13676. DOI: 10.1111/asj.13676.
- Hernández-de los Santos AD, Duran-Zamora EM, Luna-Palomera C, López-Durán S, Vázquez-Martínez IM, Muñoz-Osorio GA, Chay-Canul AJ (2022) Crecimiento post-destete y rentabilidad de corderos Pelibuey suplementados con tres diferentes concentrados comerciales en Tabasco, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 9(2): e3148. DOI: 10.19136/era.a9n2.3148.
- Huertas-Molina OF, Londoño-Vásquez D, Olivera-Angel M (2020) Hipercetonemia: bioquímica de la producción de ácidos grasos volátiles y su metabolismo hepático, *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 23(1): e1304. DOI: 10.31910/rudca.v23.n1.2020.1304.
- IPCC (2006) Guidelines for national greenhouse gas inventories. Agriculture, forestry and other land use. Intergovernmental Panel on Climate Change. 87p. <https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/vol4.html>. Fecha de consulta: 31 de julio de 2022.

- Jiménez-Santiago A, Jiménez-Ferrer G, Alayón-Gamboa A, Pérez-Luna EDJ, Piñeiro-Vázquez AT, Albores-Moreno S, Castro-Chan R (2019) Fermentación ruminal y producción de metano usando la técnica de gas *in vitro* en forrajes de un sistema silvopastoril de ovinos de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10: 298-314.
- Karabulut A, Canbolat O, Kalkan H, Gurbuzol F, Sucu E, Filya I (2007) Comparison of *in vitro* gas production, metabolizable energy, organic matter digestibility and microbial protein production of some legume hays. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20: 517-522.
- Kazemi-Bonchenari M, Khanaki H, Jafari A, Eghbali M, Poorhamdollah M, Ghaffari MH (2022) Milk feeding level and starter protein content: Effects on growth performance, blood metabolites, and urinary purine derivatives of Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science* 105: 1115-1130.
- Lombardi B, Alvarado PI, Ricci P, Guzmán SA, Gonda HL, Juliarena MP (2021) Methane and nitrous oxide emissions from dung patches deposited by grazing cattle supplemented with maize grain. *Animal Feed Science and Technology* 279: e115029. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.115029.
- Mestra LI, Santana M O, Mejia L., Ortiz CR, Paternina SE (2020) Caracterización de sistemas de alimentación de ovinos en el departamento de Córdoba, Colombia. *Archivos de zootecnia* 69: 432-443.
- Makkar HP (2004) Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing quality and safety of animal feeds* 160: 55-88.
- Martínez GDM, Pérez FXP, Mella MR, Delgadillo MAM, Rangel HL, Barcena GRB (2007) Evaluación de alimentos integrales para el engorde intensivo de ovinos. *Revista Científica* 17: 72-82.
- Martínez-Hernández BE, Salvador-Flores O, Miranda-Romero LA (2019) Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína. *Pastos y Forrajes* 42: 285-289.
- Menke KE, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 27: 7-55.
- Miranda-Romero LA, Tirado-González DN, Tirado-Estrada G, Améndola-Massiotti R, Sandoval-González L, Ramírez-Valverde R, Salem AZ (2020) Quantifying non-fibrous carbohydrates, acid detergent fiber and cellulose of forage through an *in vitro* gas production technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100: 3099-3110.
- Murillo M, Herrera E, Carrete FO, Ruiz O, Serrato JS (2012) Chemical composition, *in vitro* gas production, ruminal fermentation and degradation patterns of diets by grazing steers in

- native range of North Mexico. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 25: 1395-1403.
- NRC (2007) Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids, 1st Edition. National Research Council. National Academy Press, Washington, DC, USA. 352p.
- Opatpatanakit Y, Kellaway RC, Lean IJ, Annison G, Kirby A (1994) Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. Journal of Agricultural Research 45: 1247-1263.
- Paredes KPT (2022) Contribución de las emisiones de gas metano producidas por el ganado bovino al cambio climático. Revista Iberoamericana Ambiente & Sustentabilidad. 5: 215. DOI: 10.46380/rias.v5.e215.
- Phesatcha B, Phesatcha K, Viennaxay B, Matra M, Totakul P, Wanapat M (2022) Cricket Meal (*Gryllus bimaculatus*) as a Protein Supplement on *In Vitro* Fermentation Characteristics and Methane Mitigation. Insects 13: 129. DOI: 10.3390/insects13020129.
- Ramírez-Díaz R, Pinto-Ruiz R, Medina-Jonapá F, Guevara-Hernández F (2020) Effect of inoculants and additives on fractions of ruminal fermentation and *in vitro* degradation in sorghum silage (*Sorghum sp*). CienciaUAT 15: 172-179.
- Rodríguez R, Sosa A, Rodríguez Y (2007) La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 41: 303-311.
- Ruiz RP, Díaz AAP, de Coss AL, Díaz RR, Paniagua LFM, Hernández FG, Vengas JAV (2018) Estimación de la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) de la cerdaza. Avances en Investigación Agropecuaria 22: 35-46.
- SAGARPA (2001) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación, México. 22 de agosto de 2001.
- Salinas-Chavira J, Gutiérrez-González JC, García-Castillo R, López-Trujillo R, Duarte-Ortuño A (2011) Digestibilidad *in situ* de la materia seca de tres dietas para ovinos de engorda. Agronomía Mesoamericana 22: 379-385.
- Sánchez N, Mendoza G, Martínez J, Hernández P, Miranda L, Villarreal EBO (2019) Efecto de bloques con propionato de calcio sobre respuestas productivas en corderos y GEI *in vitro*. Revista MVZ Córdoba 24: 7188-7192.
- Sandoval-Pelcastre AA, Ramírez-Mella M, Rodríguez-Ávila NL, Candelaria-Martínez B (2020) Trees and shrubs with potential to reduce the production of methane in ruminants. Tropical and Subtropical Agroecosystems 23: 1-16.

- SAS (2015) Base SAS 9.4 procedures guide. SAS Institute. https://go.documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4_3.5/procstat/titlepage.htm. Fecha consultada: 18 marzo de 2022.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994) Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. Journal of Animal Science 72: 2980-2991.
- Sileshi G, Mitiku E, Mengistu U, Aduugna T, Fekede F (2021) Effects of dietary energy and protein levels on nutrient intake, digestibility, and body weight change in Hararghe highland and Afar sheep breeds of Ethiopia. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research 8: 185-194.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology 48:185-197.
- Tirado-González DN, Jáuregui-Rincón J, Tirado-Estrada GG, Martínez-Hernández PA, Guevara-Lara F, Miranda-Romero LA (2016) Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications. Animal Feed Science and Technology 221: 147-156.
- Van Soest PJB, Robertson JA, Lewis B (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74: 3583-3597.
- Velázquez-Duarte JA, Vega-Britez GD, Lesmo-Duarte ND, Ferreira-Agüero AMA, Giménez MA, Barreto-Pérez WS, Acosta-Resquin MF (2022) Uso de glicerina bruta en la reducción de pérdidas fermentativas de ensilaje de *Pennisetum purpureum*. Temas Agrarios 27: 378-384.
- Vélez-Terranova M, Gaona RC, Sánchez-Guerrero H (2014) Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. Tropical and Subtropical Agroecosystems 17: 489-499.
- Villalba JJ, Ates S, MacAdam JW (2021) Non-fiber Carbohydrates in Forages and Their Influence on Beef Production Systems. Frontiers in Sustainable Food Systems 5: e566338. DOI: 10.3389/fsufs.2021.566338.
- Zhang Z, Wang S, Wang M, Shahzad K, Zhang X, Qi R, Shi L (2020) Effects of *Urtica cannabina* to *Leymus chinensis* ratios on ruminal microorganisms and fiber degradation *in vitro*. Animals 10: 335. DOI: 10.3390/ani10020335.
- Zhong RZ, Fang Y, Sun HX, Wang M, ZhouDW (2016) Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. Journal of Integrative Agriculture 15: 414-42.

Tabla 1. Composición de dietas para la engorda intensiva de ovinos.

Ingredientes (%)	*Dieta				
	MM	AA	AB	BA	BB
Maíz rolado	25	27	25	15	20
Sorgo	28	25	32	22.6	30.8
Rastrojo de maíz	15	13	15	27	25
Pasta de soya	11.1	15.4	7.1	13.5	7.3
Cascarilla de soya	7	2	7	7	5
Gluten de maíz	4	4	4	6	3
Melaza	5	5	5	5	5
Grasa animal	1	4.8	1	0	0
Sal mineral	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
CaCO ₃	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Sal común	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Urea	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
**Relación F:C	22:78	15:85	22:78	34:66	30:70
Nutrientes (%)					
MS	87.6	88.1	87.5	86.6	86.5
Ce	6.6	7.5	7.4	8.3	8.0
EE	3.7	7.3	3.7	2.3	2.5
FDN	24.2	20.1	24.2	31.9	29.1
FDA	13.7	10.8	13.6	18.8	16.7
PC	16	17.2	14.5	17.2	13.8
EM, (Mcal kg ⁻¹ MS) ¹	2.8	3	2.8	2.6	2.6

PC, proteína cruda; EM, energía metabolizable; MS, materia seca; Ce; cenizas; EE, extracto etéreo; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido. ¹ valor estimado.

* Tratamientos con diferente contenido de energía metabolizable (EM, Mcal kg⁻¹ MS) y proteína cruda (PC, %); MM (2.8:16), AA (3.0:17.2), AB (2.8:14.5), BA (2.6:17.2) y BB (2.6:13.8).

** F:C, Proporción forraje:concentrado en las dietas.

Tabla 2. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* de las dietas para ovinos en engorda.

	Dieta		Parámetros		
	EM Mcal kg ⁻¹ MS	PC %	L h	S mL h ⁻¹	Vm mL g ⁻¹
MM	2.8	16.0	4.24 ^a	0.038 ^a	488.7 ^a
AA	3.0	17.2	4.24 ^a	0.038 ^a	477.5 ^{ab}
AB	2.8	14.5	4.24 ^a	0.036 ^{ab}	491.8 ^a
BA	2.6	17.2	4.24 ^a	0.034 ^b	462.1 ^b
BB	2.6	13.8	4.24 ^a	0.035 ^b	493.2 ^a

^{abc}medias con literal distinta en la misma columna son diferentes (p<0.05).

L, fase lag; S, tasa de fermentación; Vm, volumen máximo de gas; PC, proteína cruda, EM, energía metabolizable. MM, AA, AB, BA, BB; dietas con niveles altos o bajos de EM o PC.

Tabla 3. Fracciones fermentables y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS72h) de las dietas para ovinos de engorda a 72 h.

	Tratamiento		Fracciones fermentables			DIVMS72h
	EM	PC	FFR	FFM	FFL	%
	Mcal kg ⁻¹ MS	%	.----- % -----.			
MM	2.8	16.0	20.8 ^b	51.8 ^a	27.4 ^b	77.4 ^a
AA	3.0	17.2	21.9 ^a	52.3 ^a	25.8 ^c	75.3 ^b
AB	2.8	14.5	20.4 ^b	50.4 ^b	29.2 ^a	74.5 ^b
BA	2.6	17.2	20.6 ^b	49.0 ^c	30.3 ^a	69.4 ^c
BB	2.6	13.8	19.9 ^b	49.8 ^{bc}	30.3 ^a	70.9 ^c

^{abc}Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes (p<0.05).

FFR, FFM, FFL, fracciones de fermentación rápida, media y lenta.

Tabla 4. Indicadores de impacto ambiental y producción de gas *in vitro* a 24 h de incubación a 39 °C de dietas para ovinos de engorda.

	Tratamiento		Indicadores de impacto ambiental				
	EM	PC	*V _{24h}	CO ₂	CH ₄	IPCG	IIA
	Mcal kg ⁻¹ MS	%	mL g ⁻¹ MS	%	%	mL CO ₂ eq g ⁻¹ MS	CO ₂ eq
MM	2.8	16.0	211.8 ^{ab}	86.4 ^a	10.5 ^c	692.0 ^b	3.3 ^c
AA	3.0	17.2	218.2 ^a	85.3 ^{ab}	11.4 ^{bc}	754.9 ^{ab}	3.5 ^{bc}
AB	2.8	14.5	215.2 ^a	85.8 ^a	10.9 ^c	722.2 ^b	3.4 ^c
BA	2.6	17.2	198.1 ^c	83.1 ^{bc}	13.0 ^{ab}	757.3 ^{ab}	3.8 ^{ab}
BB	2.6	13.8	207.0 ^b	82.5 ^c	13.5 ^a	809.8 ^a	3.9 ^a

V_{24h}, volumen de gas a 24 h; IPCG, indicador del potencial de calentamiento global; IIA, índice de impacto ambiental.

^{abc}Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes (p<0.05)

CONCLUSIONES GENERALES

La TPG *in vitro* demuestra ser una metodología con ventajas técnicas, económicas y prácticas para determinar el valor nutritivo del alimento, así como para calcular las fracciones fermentables e indicadores de impacto atmosférico; y también para obtener variables indicadoras de la utilización de la fracción fermentable del alimento en el tracto gastrointestinal del rumiante y de la emisión de gases efecto invernadero considerando su comportamiento alimenticio. Además, estas variables son afectadas por el nivel de energía y proteína de la dieta, así como el balance o desbalance entre ellos.